

根痛平片微生物限度检查方法研究

姬俊¹, 牛萌萌¹, 刘彩娜², 王立云¹

(1. 山东省青岛市食品药品检验研究院, 山东 青岛 266073; 2. 山东省医学科学院 山东省眼科研究所 青岛眼科医院, 山东 青岛 266071)

摘要:目的 建立根痛平片的微生物限度检查方法。方法 根据2015年版《中国药典》的规定,用平皿法、中和剂法对根痛平片进行微生物限度检查法的研究。结果 利用聚山梨酯80和卵磷脂的中和作用,可消除根痛平片对枯草芽孢杆菌的抑制作用。通过加入中和剂,可采用平皿法检查根痛平片需氧菌总数、霉菌和酵母菌总数。采用常规法检查控制菌。结论 该方法适用于根痛平片的微生物限度检查。

关键词:根痛平片;微生物限度检查;方法适用性试验;中和剂

中图分类号:R284.1;R372

文献标识码:A

文章编号:1006-4931(2018)09-0020-03

Study on Microbial Limit Test of Gentongping Tablets

Ji Jun¹, Niu Mengmeng¹, Liu Caina², Wang Liyun¹

(1. Qingdao Institute for Food and Drug Control, Qingdao, Shandong, China 266073; 2. Qingdao Eye Hospital, Shandong Eye Institute, Shandong Academy of Medical Sciences, Qingdao, Shandong, China 266071)

Abstract: Objective To establish a method for microbial limit test of Gentongping Tablets. **Methods** According to the methods of Chinese pharmacopoeia (2015 edition), the method of microbial limit test of Gentongping Tablets was tested by using plate count method with or without neutralizing agent. **Results** The inhibitory effect of Gentongping Tablets on *Bacillus subtilis* could be eliminated by neutralization of polysorbate 80 and lecithin. The total number of aerobic bacteria, molds and yeasts could be tested by using plate count method with neutralizing agent. The routine method was used to test specified microorganism. **Conclusion** The method is suitable for the microbial limit test of Gentongping Tablets.

Key words: Gentongping Tablets; microbial limit test; method applicability test; neutralizing agent

根痛平片是由伸筋草、白芍、烫狗脊、续断、地黄、红花、醋乳香、醋没药、桃仁、牛膝、葛根、甘草制成的中成药,方中白芍、红花、桃仁、乳香、没药为君药^[1],功能主治活血、通络、止痛,用于风寒阻络所致颈椎病,症见肩颈疼痛、活动受限、上肢麻木等^[2]。目前,全国有4家药品生产企业有批准文号。根据2015年版《中国药典(四部)》通则1105和1106的非无菌产品微生物限度检查的相关方法^[3],本研究中对3家企业的根痛平片进行了微生物限度方法适用性试验,建立了适用于该产品的微生物限度检查方法。现报道如下。

1 仪器与材料

1.1 仪器

INE500型电热恒温培养箱(德国美墨尔特公司);H·SWX-600BS型电热恒温水温箱(上海新苗医疗器械制造有限公司);SHP-160E型生化培养箱(上海三发科学仪器有限公司);PYX-DHS-40×50型隔水式培养箱(上海跃进医疗器械厂);TD型电子天平(浙江省余姚市金诺天平仪器有限公司)。

1.2 材料

培养基:胰酪大豆胨琼脂培养基(批号为3105660),胰酪大豆胨液体培养基(批号为3105589),沙氏葡萄糖琼脂培养基(批号为3104045),沙氏葡萄糖液体培养基(批号为3104833),麦康凯琼脂培养基(批号为

3303011),麦康凯液体培养基(批号为3104618),肠道增菌液体培养基(批号为3104849),紫红胆盐葡萄糖琼脂培养基(批号为3104750),RV沙门增菌液体培养基(批号为3104847),木糖赖氨酸脱氧胆酸盐琼脂培养基(批号为3104652),均由广东环凯微生物科技有限公司提供,均符合2015年版《中国药典》培养基适用性检查的规定。

菌种:金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) [CMCC(B)26 003]、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) [CMCC(B)63 501]、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*) [CMCC(B)10 104]、白色念珠菌(*Candida albicans*) [CMCC(F)98 001]、黑曲霉(*Aspergillus niger*) [CMCC(F)98 003]、大肠埃希菌(*Escherichia coli*) [CMCC(B)44 102]、乙型副伤寒沙门菌(*Salmonella paratyphi B*) [CMCC(B)50 094]为传代不超过5代的菌种,均由中国食品药品检定研究院提供。

试药:根痛平片(承德燕峰药业有限责任公司<A厂>,规格为每片0.3g,批号分别为16914014,16914024,16914025;海口市制药厂有限公司<B厂>,规格为每片0.3g,批号分别为160701,160803,161201;北京斯利安药业有限公司<C厂>,规格为每片0.5g,批号分别为GP170302,GP170303)。卵磷脂(青岛高科园海博生物技术有限公司,批号为20170302);聚山

梨酯 80(天津市富宇精细化工有限公司,批号为 20151014)。

2 方法与结果

2.1 菌液制备

按 2015 年版《中国药典(四部)》通则 1105,1106 要求制备:将金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、枯草芽孢杆菌、大肠埃希菌、沙门菌接种于胰酪大豆胨液体培养基,于 30~35℃ 培养 24 h;将白色念珠菌接种于沙氏葡萄糖液体培养基中,于 20~25℃ 培养 3 d;将黑曲霉接种于沙氏葡萄糖琼脂培养基上,于 20~25℃ 培养 7 d。取上述金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、枯草芽孢杆菌、大肠埃希菌、沙门菌、白色念珠菌的新鲜培养物,用 0.9% 无菌氯化钠溶液制成适宜浓度的菌悬液;取上述黑曲霉的新鲜培养物加入 5 mL 含 0.05% 聚山梨酯 80 的 0.9% 无菌氯化钠溶液,洗脱孢子,将菌悬液吸至无菌试管中,用含 0.05% 聚山梨酯 80 的 0.9% 无菌氯化钠溶液制成适宜浓度的孢子悬液。

2.2 供试液制备

取供试品 10 g,以胰酪大豆胨液体培养基为稀释液,加稀释液制成 1:10 供试液(不含中和剂),取此 1:10 供试液(不含中和剂)用胰酪大豆胨液体培养基梯度稀释制成 1:100,1:1 000 供试液 1(不含中和剂)。取供试品 10 g,以含 3% 聚山梨酯 80 和 0.3% 卵磷脂的胰酪大豆胨液体培养基(以下简称含中和剂的稀释液)为稀释液,加此含中和剂的稀释液制成 1:10 供试液(含中和剂),取此 1:10 供试液(含中和剂)用含中和剂的稀释液梯度稀释制成 1:100,1:1 000 供试液 2(含中和剂)。

2.3 计数方法适用性试验

试验组:采用平皿法,取 2.2 项下供试液 1,2 各 9.9 mL 分别置于无菌试管中,在试管中分别加入 2.1 项下金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、枯草芽孢杆菌、白色念珠菌、黑曲霉菌液各 0.1 mL,混匀,使每 1 mL 供试液中含菌量 ≤ 100 cfu,取上述含有菌液的供试液 1 mL 注入平皿中,立即倾注 15~20 mL 熔化的琼脂培养基(温度不超过 45℃)。菌液对照组:取胰酪大豆胨液体培养基替代供试液,按试验组操作加入试验菌进行试验。供试品

对照组:取相应的供试液,用相应稀释液代替菌液,照试验组方法进行试验。中和剂对照组:取相应的含中和剂的稀释液代替供试品,照试验组方法进行试验。各组平行制备 2 个平皿,用于需氧菌计数的平皿使用胰酪大豆胨琼脂培养基,于 30~35℃ 培养;用于霉菌和酵母菌计数的平皿使用沙氏葡萄糖琼脂培养基,于 20~25℃ 培养。

2.4 计算

供试品试验组的回收结果=(试验组的平均菌落数-供试品对照组的平均菌落数)/菌液对照组的平均菌落数;稀释剂对照组的回收结果=稀释剂对照组的平均菌落数/菌液对照组的平均菌落数。结果见表 1 至表 2。可见,中和剂能降低根痛平片对枯草芽孢杆菌的抑菌作用,使所选的 3 家企业的 8 批样品稀释到 1:100 时对枯草芽孢杆菌的回收结果均为 0.5~2,符合药典要求。由表 2 可知,稀释剂对照组回收结果为 0.5~2,分别对 3 家企业的药品进行计数方法适用性试验,结果都符合药典要求。可用含中和剂的胰酪大豆胨液体培养基制备供试液,取 1:100 供试液(含中和剂)按照平皿法进行根痛平片的微生物限度的计数检查。

2.5 控制菌检查方法适用性试验

2.5.1 大肠埃希菌

试验组:取 2.2 项下 1:10 供试液(不含中和剂)10 mL 和菌量 ≤ 100 cfu 的大肠埃希菌接种至 100 mL 胰酪大豆胨液体培养基中。阳性对照试验组:取菌量 ≤ 100 cfu

表 1 根痛平片对枯草芽孢杆菌的计数方法适用性试验结果

厂家	批号	胰酪大豆胨液体培养基			含中和剂的胰酪大豆胨液体培养基		
		1:10	1:50	1:100	1:10	1:50	1:100
A	16914014	0.01	0.35	0.65	0.04	0.73	0.84
	16914024	0.01	0.07	0.26	0.03	0.51	0.90
	16914025	0	0.18	0.23	0.04	0.40	0.93
B	160701	0	0.01	0.23	0.01	0.30	0.61
	160803	0	0.02	0.07	0.01	0.34	0.68
	161201	0.01	0.08	0.48	0.05	0.39	0.57
C	GP170302	0.03	0.73	0.87	0.03	0.73	0.87
	GP170303	0.13	1.20	1.25	0.13	1.20	1.25

表 2 根痛平片微生物计数方法适用性试验结果

计数项目	阳性菌	1:100 供试液(含中和剂)			稀释剂对照组
		A/16914024	B/160803	C/GP170303	
需氧菌	金黄色葡萄球菌	0.88	0.92	1.09	0.97
总数	铜绿假单胞菌	1.10	1.01	0.80	1.17
	枯草芽孢杆菌	0.70	0.87	1.00	1.09
	白色念珠菌	0.90	0.92	0.98	0.86
	黑曲霉	0.86	0.82	0.86	0.81
霉菌和酵	白色念珠菌	1.07	0.94	0.99	1.07
母菌总数	黑曲霉	0.94	0.92	0.88	0.94

的大肠埃希菌接种至 100 mL 胰酪大豆胨液体培养基中。供试品对照组:取 2.2 项下 1:10 供试液(不含中和剂)10 mL 至 100 mL 胰酪大豆胨液体培养基中。阴性对照试验组:取胰酪大豆胨液体培养基 10 mL 接种至 100 mL 胰酪大豆胨液体培养基中。以上各组于 30~35℃ 培养 24 h 后,分别取上述各组培养物 1 mL 接种于麦康凯液体培养基中,42~44℃ 培养 48 h。将其培养物分别划线接种于麦康凯琼脂培养基平板上,30~35℃ 培养 72 h。

2.5.2 耐胆盐革兰阴性菌

预培养:取 2.2 项下 1:10,1:100,1:1 000 供试液(不含中和剂)10 mL 置于无菌试管中,于 20~25℃ 培养 2 h。试验组:分别取以上 1:10,1:100,1:1 000 供试液 1 mL 和菌量≤100 cfu 的大肠埃希菌接种或铜绿假单胞菌至 10 mL 肠道增菌液体培养基中。阳性对照试验组:取菌量≤100 cfu 的大肠埃希菌或铜绿假单胞菌接种至 10 mL 肠道增菌液体培养基中。供试品对照组:分别取以上 1:10,1:100,1:1 000 供试液 1 mL 至 10 mL 肠道增菌液体培养基中。阴性对照试验组:取胰酪大豆胨液体培养基 1 mL 接种至 10 mL 肠道增菌液体培养基中。以上各组于 30~35℃ 培养 48 h 后,将上述各组培养物接种于紫红胆盐葡萄糖琼脂培养基平板上,30~35℃ 培养 24 h。

2.5.3 沙门菌

试验组:取供试品 10 g 和菌量≤100 cfu 的沙门菌接种至 200 mL 胰酪大豆胨液体培养基中。阳性对照试验组:取菌量≤100 cfu 的沙门菌接种至 200 mL 胰酪大豆胨液体培养基中。供试品对照组:取供试品 10 g 至 200 mL 胰酪大豆胨液体培养基中。阴性对照试验组:200 mL 胰酪大豆胨液体培养基。以上各组于 30~35℃ 培养 24 h 后,分别取上述各组培养物 0.1 mL 接种于 RV 沙门增菌液体培养基中,30~35℃ 培养 24 h。将其培养物分别划线接种于木糖赖氨酸脱氧胆酸盐琼脂培养基平板上,30~35℃ 培养 48 h。结果见表 3。可见,试验组检出阳性菌,供试品对照组和阴性对照试验组均为阴性。因此,可按以上控制菌的检查方法对大肠埃希菌、耐胆盐革兰阴性菌和沙门菌进行检验。

表 3 控制菌检查方法适用性试验结果

控制菌	试验组			阳性对照 试验组	供试品 对照组	阴性对照 试验组
	厂家 A/ 16914024	厂家 B/ 160803	厂家 C/ GP170303			
大肠埃希菌	+	+	+	+	-	-
耐胆盐革兰阴性菌	+	+	+	+	-	-
沙门菌	+	+	+	+	-	-

注:“+”代表检出,“-”代表未检出。

3 讨论

根痛平片由 12 味中药制成,除部分白芍粉碎成细粉直接混合制粒,其他中药均经水煎煮。研究表明,白芍、红花、伸筋草、狗脊、乳香、牛膝的水提物对大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌等有不同程度的抑制作用^[4-9]。预试验结果显示,根痛平片对药典中用于方法适用性试验要求的枯草芽孢杆菌的抑制作用明显强于其余 4 种菌。因此,首先筛选出能消除根痛平片对枯草芽孢杆菌的方法,进而确定根痛平片的菌落计数方法。

考察常规平皿法时,采用不同稀释条件,对枯草芽孢杆菌进行回收试验。结果只有北京斯利安药业有限公司的供试品在 1:50 稀释级能使回收符合要求,其他 2 家的供试品在 1:100 稀释级的回收结果均小于 0.5。聚山梨酯 80 和卵磷脂联用能降低药物的抑菌作用^[10-11],故采用这 2 种中和剂来消除成分复杂的根痛平片的抑菌作用。使用含中和剂的稀释剂制备供试品,需要制备成 1:100 供试液,才能使 3 家企业的供试品对枯草芽孢杆菌的回收均为 0.5~2,符合药典要求。

综上,平皿法和中和剂联用能消除根痛平片对枯草芽孢杆菌的抑制,可为其微生物限度检查方法提供参考。

参考文献:

- [1] 刘志刚,刘蔚,王景春,等.根痛平治疗腰椎骨质增生症的疗效观察[J].河南大学学报(医学版),2009,28(1):70-71.
- [2] WS-10252(ZD-0252)-2002-2012Z,国家食品药品监督管理局标准[S].
- [3] 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,2015:140-149.
- [4] 彭丹,马琼丽,陈泽慧,等.40 种中药提取物对 6 种临床常见感染菌株的体外抑菌活性观察[J].山东医药,2017,57(27):27-30.
- [5] 白亮亮,邹鸣峰,王恒,等.3 种红花的体外抑菌作用研究[J].食品科技,2015,40(2):311-314.
- [6] 李成叶,袁硕峰,林奕,等.22 味祛风湿中药对 2 个分离菌株的体外抑菌作用[J].动物医学进展,2010,31(11):43-46.
- [7] 饶华强,李富荣,张海宾.乳香对几种病原微生物抗性作用的初步研究[J].信阳师范学院学报(自然科学版),2005,18(1):54-56.
- [8] 陈希文,赖守勋,尹苗.22 种中药多糖对猪源金黄色葡萄球菌的体外抑菌活性[J].江苏农业科学,2016,44(9):264-267.
- [9] 郭婕,胡春红,赵锦慧.4 种中草药提取物抑菌效果与其有效成分含量的相关性[J].周口师范学院学报,2013,30(5):95-97.
- [10] 张光华,余立.聚山梨酯 80 和卵磷脂在化学药微生物限度检查时的中和作用[J].药物分析杂志,2008,28(7):1127-1130.
- [11] 姬俊,刘婷婷,牛萌萌,等.卵磷脂、聚山梨酯-80 联用在消除中药制剂抑菌活性中的作用[J].中国药师,2017,20(3):586-588.

(收稿日期:2017-11-05)