

· 检验检测 ·

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2019.11.014

茵丹颗粒微生物限度检查方法学验证

邓莉,周剑[△],胡婧,胡斌,马攀

(陆军军医大学第一附属医院药剂科,重庆 400038)

摘要:目的 建立茵丹颗粒的微生物限度检查方法。方法 根据2015年版《中国药典(四部)》通则1105非无菌产品微生物限度检查项中的微生物计数法,以及通则1106非无菌产品微生物限度检查项中的控制菌检查法和通则1107非无菌药品微生物限度标准进行方法适用性试验。结果 采用稀释法(1:100)测定需氧菌总数;采用常规法测定霉菌和酵母菌总数,并进行控制菌检查。结论 所建立的方法可作为茵丹颗粒微生物限度的检查方法。

关键词:茵丹颗粒;微生物限度检查;方法学适用性试验

中图分类号:R932;R284.1

文献标识码:A

文章编号:1006-4931(2019)11-0047-03

Methodological Validation of Microbial Limit Test of Yindan Granules

DENG Li, ZHOU Jian, HU Jing, HU Bin, MA Pan

(Department of Pharmacy, The First Affiliated Hospital of Army Medical University, Chongqing, China 400038)

Abstract: Objective To establish a microbial limit test method of Yindan Granules. **Methods** According to the general rule 1105 (microbial counting method for microbial limit test of non-sterile products), the general rule 1106 (the control bacteria examination method for microbial limit test of non-sterile products), the general rule 1107 (the test method for suitability of microbiological limits for non-sterile drugs) of *Chinese Pharmacopoeia* (2015 edition, volume IV), the applicability of the method was tested. **Results** Dilution method (1:100) could be used to determine the total number of aerobic bacteria. The routine method could be used to determine the total number of mold and yeasts, and it also could be used to examine the control bacteria. **Conclusion** The established method can be used for the microbial limit test of Yindan Granules.

Key words: Yindan Granules; microbial limit test; methodological applicability test

茵丹颗粒为我院自制制剂,具有清热利湿、凉血活血等功效,主治痤疮、脂溢性皮炎,疗效确切,其中连翘、黄芩、地榆、茵陈等中药材具有抗病原微生物作用^[1-6]。中成药的不同成分和浓度对微生物有着不同程度的抑制和杀灭作用^[7-10]。由于抑菌成分的干扰,采用常规法进行微生物限度检查,其结果不能真实反映其污染微生物的状况^[11],因此采用适当的方法排除其抑菌成分的干扰,提高中成药污染微生物的检出率至关重要^[12]。为保证微生物限度检查法结果的准确性,本研究中依据2015年版《中国药典(四部)》1105非无菌产品微生物限

度检查^[13]中微生物计数法、1106非无菌产品微生物限度检查,控制菌检查法中方法验证试验,以及和通则1107非无菌药品微生物限度标准的要求,建立了茵丹颗粒微生物限度检查方法,并进行验证,确保检测方法的可行性。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Thermo Scientific-1381 A2型生物安全柜(美国Thermo公司);BL150型电子天平(梅特勒托利多仪器<上海>有限公司);LRH-150F型生化培养箱(重庆

第一作者:邓莉,女,大学本科,主管药师,研究方向为药物分析,(电话)023-68765490(电子信箱)2217796811@qq.com。

[△]通信作者:周剑,男,大学本科,高级工程师,研究方向为药品微生物检验,(电话)023-86072731。

[7] ILLUM L. Nasal drug delivery: new developments and strategies[J]. Drug Discov Today, 2002, 7(23): 1184-1189.

[8] 吴慧,吴闻折. 经鼻给药增加药物靶向的制剂方法[J]. 世界临床药物, 2015, 36(1): 50-55.

[9] 盛竹君,徐维平,徐婷娟,等. 脂质体药物传输系统的研究新进展[J]. 中国药业, 2015, 24(23): 6-9.

[10] 晏亦林,周莉玲,叶勇,等. 磷酸川芎嗪脂质体大鼠在体鼻黏膜吸收研究[J]. 中药新药与临床药理, 2007, 18(5): 406-408.

[11] 刘煜德,孙寒静,李荣,等. 冰片对川芎嗪经鼻腔吸收入脑的影响[J]. 中国中药杂志, 2008, 33(3): 259-261.

[12] 王勇,张忠义,徐峰,等. 冰片对川芎嗪血药浓度和在脑中分布的影响[J]. 中国药业, 2006, 15(1): 30-31.

[13] 张雨曦,李万玉. 盐酸川芎嗪脂质体的制备及其理化性质的表征[J]. 华西药学杂志, 2014, 29(2): 113-115.

[14] 杜兆香,鞠建峰. 正交试验优选盐酸川芎嗪脂质体的制备工艺[J]. 中国药房, 2011, 22(35): 3303-3304.

(收稿日期:2018-11-02)

四达实验仪器公司);MJ-180-II型霉菌培养箱(上海跃进医疗器械有限公司);LDZX-75KBS型立式压力蒸汽灭菌器(上海申安医疗器械厂)。

1.2 材料

试药:茵丹颗粒(陆军军医大学第一附属医院药剂科,批号为18032701,规格为每袋10g)。

培养基:胰酪大豆胨液体培养基(批号为161205),胰酪大豆胨琼脂培养基(批号为1612192),沙氏葡萄糖液体培养基(批号为170815),沙氏葡萄糖琼脂培养基(批号为1702134),麦康凯液体培养基(批号为161205),麦康凯琼脂培养基(批号为161212),均由北京三药科技开发公司提供。

稀释剂、冲洗剂:pH 7.0 氯化钠-蛋白胨缓冲液(北京三药科技开发公司,批号为170519);0.9% 氯化钠溶液(西南药业股份有限公司,批号为17034002)。

菌种:金黄色葡萄球菌[CMCC(B)26003],枯草芽孢杆菌[CMCC(B)63501],铜绿假单胞菌[CMCC(B)10104],白色念珠菌[CMCC(F)98001],黑曲霉菌[CMCC(F)98003],大肠埃希菌[CMCC(B)44102],均由中国食品药品检定研究院提供,试验所用菌株均为第3代。

2 方法与结果

2.1 菌液制备

取经胰酪大豆胨液体培养基35℃培养24h的金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、铜绿假单胞菌、大肠埃希菌液体培养物,分别用0.9%氯化钠溶液稀释成适宜浓度的菌悬液,作活菌计数备用。

取经沙氏葡萄糖液体培养基25℃培养48h的白色念珠菌液体培养物,用0.9%氯化钠溶液稀释成适宜浓度的菌悬液,作活菌计数备用。

取经沙氏葡萄糖琼脂培养基25℃培养7d的黑曲霉菌斜面培养物,加入含0.05%(V/V)聚山梨酯80的0.9%氯化钠溶液,将孢子洗脱,吸出孢子悬液(用管口带有薄无菌棉花或纱布能过滤菌丝的无菌毛细吸管)置无菌试管内,用0.9%氯化钠溶液制成适宜浓度的孢子悬液。

2.2 微生物限度检查方法验证

2.2.1 供试液制备

取样品10g,加pH 7.0 氯化钠-蛋白胨缓冲液至100mL,摇匀,制成1:10的供试液。取供试液10mL,加pH 7.0 氯化钠-蛋白胨缓冲液至100mL,摇匀,制成1:100供试液。

2.2.2 计数方法适用性试验

试验组^[14]:分别精密吸取2.3.1项下1:10供试液和1:100供试液9.9mL,各5份,每份中分别加入金黄

色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、枯草芽孢杆菌、白色念珠菌及黑曲霉菌菌悬液各0.1mL,使每1mL含菌数不大于100cfu,混匀,吸取各染菌供试液1mL注入平皿中,每份平行制备2个平皿,倾注胰酪大豆胨琼脂培养基,置35℃培养3d,测定需氧菌总数。取2.3.1项下1:10供试液9.9mL,共2份,每份中分别加入白色念珠菌和黑曲霉菌菌悬液各0.1mL,使每1mL含菌数不大于100cfu,混匀,吸取各染菌供试液1mL注入平皿中,每份平行制备2个平皿,倾注沙氏葡萄糖琼脂培养基,置25℃培养5d,测定霉菌及酵母菌总数。

菌液对照组:吸取pH 7.0 氯化钠-蛋白胨缓冲液9.9mL,共5份,每份中分别加入金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、铜绿假单胞菌、白色念珠菌、黑曲霉菌菌悬液各0.1mL,使每1mL含菌数不大于100cfu,混匀,分别从试验菌试管中吸取1mL注入平皿中,每株试验菌平行制备2个平皿,倾注胰酪大豆胨琼脂培养基;另取pH 7.0 氯化钠-蛋白胨缓冲液9.9mL,共2份,每份中分别加入白色念珠菌、黑曲霉菌菌悬液各0.1mL,使每1mL含菌数不大于100cfu,混匀,分别从试验菌试管中吸取1mL注入平皿中,每株试验菌平行制备2个平皿,倾注沙氏葡萄糖琼脂培养基。

供试品对照组:分别精密吸取1:10和1:100供试液各1mL注入平皿,分别平行制备4个平皿,其中4个平皿倾注胰酪大豆胨琼脂培养基,作为需氧菌总数的供试品对照组;另外4个平皿倾注沙氏葡萄糖琼脂培养基,作为霉菌和酵母菌总数的供试品对照组。

稀释剂组:取相应量稀释液替代供试品,同试验组方法操作,按试验组方法测定其菌数,平行制备2个平皿。

验证结果:依照下列公式,计算加菌回收率,试验组菌比值=(试验组平均菌落数-供试品对照组的平均菌落数)/菌液对照组的平均菌落数。按2015年版《中国药典(四部)》1105,1106,1107项下^[2]规定进行结果判断,回收率比值应在0.5~2.0。结果见表1至表2。可见,需氧菌总数采用稀释法(1:100)、霉菌和酵母菌总数采用常规法,各株菌回收率均为0.5~2.0,符合2015年版《中国药典(四部)》微生物限度检查微生物计数检查验证要求。

2.2.3 控制菌-大肠埃希菌检查

试验组:取10mL 2.3.1项下1:10供试液及每1mL含菌量不大于100cfu大肠埃希菌菌悬液,同时加入100mL胰酪大豆胨液体培养基中,混匀,35℃培养24h。取上述培养物1mL接种至100mL麦康凯液体培养基中,42℃培养24h。取麦康凯液体培养物划线接种至麦康凯琼脂培养基平板上,35℃培养24h,观察。

表1 1:10及1:100供试液需氧菌总数回收率比值
试验结果($n=3$)

菌种类型	试验次数	试验组 (cfu/mL)		菌液对照组 (cfu/mL)		供试品对照组 (cfu/mL)		回收率 比值	
		A	B	A	B	A	B	A	B
金黄色葡萄球菌	1	12	56	88	73				
	2	10	60	96	67	0	0	0.13	0.84
	3	13	62	89	71				
铜绿假单胞菌	1	16	96	98	86				
	2	14	100	99	92	0	0	0.16	1.10
	3	17	94	97	88				
枯草芽孢杆菌	1	13	52	73	90				
	2	15	56	80	108	0	0	0.19	0.56
	3	16	53	76	95				
白色念珠菌	1	50	73	65	70				
	2	50	70	72	62	0	0	0.73	1.07
	3	55	69	75	67				
黑曲霉菌	1	68	86	76	77				
	2	75	92	81	68	0	0	0.93	1.22
	3	72	85	75	70				

注:A为1:10,B为1:100。

表2 1:10供试液霉菌和酵母菌回收率比值试验结果($n=3$)

菌种类型	试验次数	试验组 (cfu/mL)	菌液对照组 (cfu/mL)	供试品对照组 (cfu/mL)	回收率 比值
白色念珠菌	1	77	89		
	2	78	93	0	0.86
	3	73	82		
黑曲霉菌	1	84	86		
	2	90	92	0	0.98
	3	86	88		

菌液对照组:不加供试液,其余操作同试验组。

供试品对照组:取2.3.1项下1:10供试液10 mL,以稀释液代替菌液其余操作同试验组。

稀释剂组:以稀释液代替供试液,不加菌液,其余操作同试验组。观察其菌落形态。试验组和菌液对照组大肠埃希菌24 h试验菌生长良好,供试品对照组24 h无菌生长,阴性对照组无菌生长。可见,采用常规法控制菌能正常检出,阴性对照未检出。符合2015年版《中国药典(四部)》微生物限度检查控制菌检查验证要求,故常规法可用于菌丹颗粒的控制菌检查。

3 讨论

菌丹颗粒在检查需氧菌总数时,由于组分中黄芩、连翘、地榆、茵陈对金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、枯草芽孢杆菌均有一定的抑制作用^[1]。由本研究结果可见,1:10供试液需氧菌总数测定金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、枯草芽孢杆菌回收率比值均未达到试验要

求,与文献[1]报道一致。通过稀释法能有效清除抑菌成分,达到检验目的,保证检查方法的完整性和可靠性。同时,这4味中药对大肠埃希菌均有抑制作用,但茵丹颗粒采用常规法能达到试验要求,考虑茵丹颗粒为水提法,在制备过程中,抑制大肠杆菌的成分浓度未达到有效MIC。其中连翘对大肠埃希菌作用较弱,乙醇提取物作用强于水提取物^[15]。经过验证,茵丹颗粒的微生物限度检查方法需氧菌总数检查可采用稀释法(1:100),霉菌和酵母菌总数检查可采用常规法,控制菌检查采用常规法,试验菌回收率及控制菌检查结果均符合规定。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典临床用药须知:中药饮片卷[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:184,240,759,586.
- [2] 张广平. 黄芩苷对牙龈卟啉单胞菌生物膜的抑菌实验研究[J]. 中国现代药物应用,2011,5(14):87-88.
- [3] 杜仲业,陈一强,孔晋亮,等. 黄芩素对金黄色葡萄球菌生物膜抑制作用的体外研究[J]. 中国现代医药杂志,2012,22(12):19-23.
- [4] 谭黎明,唐小异,赵敏,等. 黄连、黄芩提取物对烫伤后感染铜绿假单胞菌的药效初步观察[J]. 湖南师范大学学报(医学版),2011,8(1):79-81.
- [5] 王业梅,程慧娟. 连翘苷对铜绿假单胞菌黏附功能及生物膜形成能力的影响[J]. 中成药,2013,35(4):832-834.
- [6] 李仲兴,王秀华,赵建宏,等. 连翘对金黄色葡萄球菌及表皮葡萄球菌的体外抗菌活性研究[J]. 天津中医药,2007,24(4):328-331.
- [7] 王洪家. 解毒散结颗粒《中国药典》2015年版微生物限度检查方法学验证[J]. 天津药学,2016,28(4):18-19.
- [8] 刘静. 探究常见抗菌中药在病原性细菌中的功效[J]. 临床医药文献杂志,2017,4(30):5885-5886.
- [9] 朱广平,徐晓玲. 黄芩对制剂微生物限度检查方法的影响[J]. 无线互联科技,2014(6):219.
- [10] 薛建江,乔海霞,刘进军,等. 6种常见抗菌中药对3株常见病原性细菌的抑菌作用检测[J]. 河北北方学院学报(医学版),2009,41(5):578.
- [11] 耿敬军,张俊. 药品微生物检查验证试验现状调查与建议[J]. 中国药房,2006,17(21):1652.
- [12] 黄英. 8种中成药微生物限度检查法比较[J]. 中国药师,2011,14(7):1064-1065.
- [13] 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,2015:140-151.
- [14] 国家药典委员会. 中国药典分析检测技术指南[M]. 北京:中国医药科技出版社,2017:567.
- [15] 李德成,刘庆燕. 连翘不同提取物对大肠埃希菌体外抑菌作用比较[J]. 西南国防医药,2011,21(10):1059-1060.

(收稿日期:2018-10-08)