

· 检验检测 ·

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2019.14.013

3种中药口服液体制剂抑菌效力测定与评价*

曹寒梅^{1,2}, 杨晓莉³, 蔡虎⁴, 常春¹, 傅强^{1△}

(1. 西安交通大学药学院, 陕西 西安 710061; 2. 陕西浩瀚管理技术咨询有限公司, 陕西 西安 710065; 3. 陕西省食品药品监督检验研究院, 陕西 西安 710065; 4. 陕西省医疗器械质量监督检验院, 陕西 咸阳 712046)

摘要:目的 测定和评价3种中药口服液体制剂的抑菌效力。方法 按2015年版《中国药典(四部)》通则1121抑菌效力检查法,以金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、大肠埃希菌、白色念珠菌和黑曲霉为试验菌株,分别加至银翘解毒合剂、止咳枇杷合剂、参术止带糖浆中,进行微生物的挑战试验,在不同时间点检测样品中微生物的存活菌落数,并换算成对数(lg)值。结果 3种样品的抑菌效力符合2015年版《中国药典(四部)》相关规定。结论 银翘解毒合剂、止咳枇杷合剂、参术止带糖浆抑菌效力充分,可避免在贮藏和使用过程中引发微生物污染。

关键词: 中药口服液体制剂; 抑菌效力; 药品质量; 微生物污染

中图分类号: R932; R284.1; R286.0

文献标识码: A

文章编号: 1006-4931(2019)14-0037-03

Determination and Evaluation of Antimicrobial Effectiveness of Three Oral Liquid Preparations of Traditional Chinese Medicine

CAO Hanmei^{1,2}, YANG Xiaoli³, CAI Hu⁴, CHANG Chun¹, FU Qiang¹

(1. School of Pharmacy, Xi'an Jiaotong University, Xi'an, Shaanxi, China 710061; 2. Shaanxi Haohan Management Technology Consultation Co., Ltd., Xi'an, Shaanxi, China 710065; 3. Shaanxi Institute for Food and Drug Control, Xi'an, Shaanxi, China 710065; 4. Shaanxi Institute of Medical Device Quality Supervision and Inspection, Xianyang, Shaanxi, China 712046)

Abstract: Objective To determine and evaluate the antimicrobial effectiveness of three oral liquid preparations of traditional Chinese medicine. **Methods** According to the requirements of antimicrobial effectiveness of the general rule 1121 in the *Chinese Pharmacopoeia* (2015 edition, volume IV), *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Candida albicans* and *Aspergillus niger* were used as the test strains and added to the three oral liquid preparations of traditional Chinese medicine (Yinqiao Jiedu Mixture, Zhike Pipa Mixture and Shenshu Zhidai Syrup) for the challenge test of microorganism, the number of viable bacteria in samples was determined at each time points. **Results** The antimicrobial effectiveness of three samples met the relevant requirements of the *Chinese Pharmacopoeia* (2015 edition, volume IV). **Conclusion** Yinqiao Jiedu Mixture, Zhike Pipa Mixture and Shenshu Zhidai Syrup have sufficient antimicrobial effectiveness, which can avoid microbial contamination during storage and use.

Key words: oral liquid preparations of traditional Chinese medicine; antimicrobial effectiveness; quality of drug; microbial contamination

*基金项目: 2020年版《中国药典》药品标准提高项目[15]。

第一作者: 曹寒梅, 女, 大学本科, 工程师, 主要从事药品微生物检测及实验室体系建立和认证咨询工作, (电话) 029-88225459 (电子信箱) 281583332@qq.com。

△通信作者: 傅强, 男, 博士研究生, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为药物光学对映体的分离, (电子信箱) fuqiang@xjtu.edu.cn。

参考文献:

- [1] 周博. 广西金秀大瑶山瑶族地区灵香草历史文化考察[D]. 南宁: 广西民族大学, 2011.
- [2] 胡展育, 詹云静. 灵香草的研究进展[J]. 安徽农业科学, 2012, 40(29): 14240-14242.
- [3] 江苏新医学院. 中药大辞典: 下册[M]. 上海: 上海人民出版社, 1977: 2470.
- [4] 杨瑞云, 李远, 何瑞杰, 等. 灵香草提取物的抑菌活性研究[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(7): 3035-3036.
- [5] 郑娜, 李远, 徐伟峰, 等. 灵香草乙酸乙酯部分抗菌活性及成分研究[J]. 时珍国医国药, 2015, 27(1): 60-61.
- [6] 龚俊俊, 王有为. 广西灵香草挥发油化学成分[J]. 植物资源与环境学报, 2004, 13(3): 59-61.
- [7] 莫彬彬, 余德顺, 李典鹏, 等. 广西灵香草提取物的化学成分研究及香气评价[J]. 香料香精化妆品, 2003, 2(1): 5-7.
- [8] 文永新, 李典鹏, 莫彬彬. 超临界CO₂萃取灵香草净油的研究[J]. 广西科学, 2002, 9(3): 174-175.
- [9] 张德伟, 阳文武, 封海霞, 等. 中药质量检测体系建设的思考与对策[J]. 中国药业, 2016, 25(16): 4-6.
- [10] 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.
- [11] 朱凯, 毛连山, 朱新宝. 超临界CO₂萃取灵香草精油及其化学成分研究[J]. 精细化工, 2005, 22(9): 681-684.
- [12] 袁萍, 袁晓. 灵香草净油化学成分分析及杀虫活性组分的应用研究[J]. 武汉植物学研究, 2007, 25(4): 417-420.
- [13] 刘贤贤, 张业, 覃文, 等. 灵香草浸膏及其精油是我抗氧化活性研究[J]. 食品工业科技, 2010, 12(31): 137-138.
- [14] 闫旭宇, 李梦妆, 李玲. 灵香草总黄酮的提取及对羟自由基的清除效率[J]. 热带作物学报, 2017, 38(8): 1434-1467.

(收稿日期: 2018-12-12)

中药口服液体剂(如合剂、糖浆剂、酒剂等)多含动植物成分,蛋白质和糖分含量高,且原材料中携带大量微生物,产品在生产、贮藏和使用过程中易受微生物污染,甚至发生霉变,故应确认药物的抗菌活性。如药品本身抑菌效力不足,应根据制剂特性添加适宜的抑菌剂,以防止潜在的微生物污染^[1-5]。抑菌剂(也称防腐剂)是一类防止或限制微生物生长与繁殖的化学药品,其主要作用是保证药剂质量,防止药剂尤其是多剂量包装制剂的微生物污染^[6]。银翘解毒合剂、止咳枇杷合剂、参术止带糖浆均为多剂量口服制剂,使用过程中会多次打开包装,有被污染的风险,其处方中需添加抑菌剂,因抑菌剂有毒,故添加量应为最低有效量^[7]。目前,国内对中药制剂抑菌效力的研究较少。本研究中考察了上述3种口服液体剂的抑菌效力是否符合卫生安全。现报道如下。

1 仪器、材料与试药

仪器:LDZX-80KCS型压力蒸汽灭菌器(上海申安医疗器械厂);HFsafe-1800TE II, B2型生物安全柜(上海力申科学仪器有限公司);LRH-250F型生化培养箱;MJ 250FI型霉菌培养箱(上海一恒科学仪器有限公司);VORTEX-5型涡旋混合器(海门市其林贝尔仪器制造有限公司);Densi CHEK Plus比浊仪(美国生物梅里埃公司)。

培养基及稀释液:胰酪大豆胨琼脂培养基(TSA),沙氏葡萄糖琼脂培养基(SDA),胰酪大豆胨液体培养基(TSB),沙氏葡萄糖液体培养基(SDB),pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液,均由北京三药科技开发公司提供,培养基适用性检查符合2015年版《中国药典》要求。

菌种:细菌,包括金黄色葡萄球菌[CMCC(B)26003]、铜绿假单胞菌[CMCC(B)10104]和大肠埃希菌[CMCC(B)44102];真菌,包括白色念珠菌[CMCC(F)98001]和黑曲霉[CMCC(F)98003]。上述5种标准菌株均购自中国食品药品检定研究院,工作用菌株为第2代。

试药:银翘解毒合剂(样品A为每瓶100 mL,抑菌剂为山梨酸,含量为0.1%);止咳枇杷合剂(样品B为每瓶120 mL,抑菌剂为苯甲酸钠,含量为0.26%);参术止带糖浆(样品C为每瓶210 mL,抑菌剂为苯甲酸钠,含量为0.30%)。

2 方法与结果

2.1 菌液制备

接种金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌及铜绿假单胞菌的新鲜培养物至TSB液体培养基中,35℃培养18 h;接种白色念珠菌于SDB液体培养基,25℃培养24 h;用0.9%无菌氯化钠溶液稀释并制成试验所需浓度的菌悬液。接种黑曲霉的新鲜培养物至SDA琼脂培养基中,25℃

培养7 d或直至获得丰富的孢子,加入3~5 mL含0.05%聚山梨酯80的0.9%无菌氯化钠溶液,将孢子洗脱,然后吸出孢子悬液置无菌试管内;用含0.05%聚山梨酯80的0.9%无菌氯化钠溶液稀释,并制成试验所需浓度的菌悬液。

2.2 方法学考察

供试液制备:取各样品10 mL,分别加入90 mL pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液,45℃恒温振荡15 min,制成1:10(V:V)的供试液。

计数方法适用性试验:取5种供试液,分装于5个无菌试管中,每管装量9.9 mL,再分别加入含菌量不大于 10^4 cfu/mL的金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、大肠埃希菌、白色念珠菌、黑曲霉试验菌液0.1 mL。用0.1 mL pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液代替菌液同法制备供试品对照组,以及不加样品的菌液对照组。分别吸取试验组、供试品对照组、菌液对照组液体各1 mL,置直径90 mm的无菌平皿中,平行2份,细菌注入约20 mL温度不超过45℃融化的TSA培养基,摇匀,凝固后置35℃倒置培养2~3 d;真菌注入约20 mL不超过45℃融化的SDA培养基,摇匀,凝固后置25℃倒置培养3~5 d。

计数方法适用性试验回收率: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回收率,结果见表1。各试验菌的回收率均在0.8~1.0范围内,符合要求,说明抑菌效力试验中的微生物存活菌落数的测试可采用平皿法(1:10, 1 mL)进行。

表1 计数方法适用性回收试验结果

样品	金黄色葡萄球菌	大肠埃希菌	铜绿假单胞菌	白色念珠菌	黑曲霉
A	0.94	1.03	0.82	0.96	0.95
B	0.83	0.95	0.84	0.90	0.95
C	0.78	1.03	0.78	0.95	0.96

2.3 抑菌效力测试^[8-10]

2.3.1 样品制备

菌悬液:首先制备浓度较高、干扰较少的菌悬液。取2.2项下制备好的新鲜液体培养物铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、白色念珠菌,离心收集菌体,采用比浊法制成每1 mL含菌数约为 10^8 cfu的菌悬液。取多份含有丰富孢子的黑曲霉琼脂培养物,2.1项下方法制成每1 mL含孢子数约为 10^8 cfu的孢子悬液。

供试品:3种样品均含有少量沉淀,且原包装装量较满,开启后密封性不好,加入菌液不易混匀,故选在无菌瓶中试验。每种样品各取3瓶,在500 mL无菌瓶中混合均匀后,无菌条件下取20 mL置无菌玻璃瓶中,按目标菌的个数平行制备5瓶,每瓶接种制备好的5种菌悬液各0.2 mL(接种菌悬液的体积不得超过供试品体积的1%),

使 1 mL 供试品接种菌量为 $10^5 \sim 10^6$ cfu, 充分混合, 使供试品中的试验菌均匀分布。

2.3.2 初始加菌量计数

在上述“供试品”项下试验的同时, 分别吸取 1 mL 供试品, 置直径 90 mm 的无菌平皿中, 平行 2 份, 按 2.2 项下方法操作及培养, 得 1 mL 供试品中各试验菌初始加菌量。

2.3.3 试验方法及结果

将 2.3.1 项下含菌液供试品置 25 °C 培养箱中避光贮存, 依据 2015 年版《中国药典(四部)》通则 1121“抑菌效力检查法”项下抑菌效力评价标准表, 培养 14 d 和 28 d 时, 分别取供试品各 1 mL, 通过梯度稀释测定每份所含菌落数, 测定细菌用胰酪大豆胨琼脂培养基, 测定真菌用沙氏葡萄糖琼脂培养基。根据存活菌数测定结果, 计算 1 mL 供试品各试验菌所加的菌落数及各间隔时间的菌落数。结果见表 2。

表 2 抑菌效力试验结果

样品	菌种	0 h			14 d			28 d		
		菌数($\times 10^5$, cfu)	lg 值		菌数(cfu)	lg 值	lg 降	菌数(cfu)	lg 值	lg 降
A	金黄色葡萄球菌	4.10	5.61	<10	<1	>4.61	<10	<1	NI	
	大肠埃希菌	5.35	5.73	<10	<1	>4.73	<10	<1	NI	
	铜绿假单胞菌	4.20	5.62	<10	<1	>4.62	<10	<1	NI	
	白色念珠菌	2.45	5.39	460	2.66	2.73	<10	<1	NI	
	黑曲霉	3.65	5.56	320	2.51	3.05	90	1.95	NI	
B	金黄色葡萄球菌	4.10	5.61	<10	<1	>4.61	<10	<1	NI	
	大肠埃希菌	5.35	5.73	<10	<1	>4.73	<10	<1	NI	
	铜绿假单胞菌	4.20	5.62	<10	<1	>4.62	<10	<1	NI	
	白色念珠菌	2.45	5.39	<10	<1	>4.39	<10	<1	NI	
	黑曲霉	3.65	5.56	120	2.08	3.48	30	1.48	NI	
C	金黄色葡萄球菌	4.10	5.61	<10	<1	>4.61	<10	<1	NI	
	大肠埃希菌	5.35	5.73	<10	<1	>4.73	<10	<1	NI	
	铜绿假单胞菌	4.20	5.62	<10	<1	>4.62	<10	<1	NI	
	白色念珠菌	2.45	5.39	500	2.70	2.69	20	1.30	NI	
	黑曲霉	3.65	5.56	6 500	3.81	1.75	1 700	3.23	NI	

注: 培养 28 d 时, 试验菌增加数的 lg 值相比培养 14 d 时均不超过 0.5。NI 指未增加, 即前一个测定时间, 试验菌增加的数量不超过 0.5lg。

2015 年版《中国药典(四部)》对口服液体剂抑菌效力判断标准要求, 培养 14 d 时, 细菌 lg 值减少 3, 真菌 lg 值减少 1; 培养 28 d 时, 细菌、真菌未增加(与 14 d 比较, 试验菌增加数量的 lg 值不超过 0.5)。将上述试验

结果与判断标准进行比较, 3 种样品对细菌的抑制结果与接菌量比较, 培

养 14 d 及 28 d 菌落数 lg 值下降均大于 4.6, 说明该 3 种样品对细菌的抑制能力较强, 符合要求。3 种样品对真菌的抑制结果与接种菌量比较, 培养 14 d 时的 lg 值下降均大于 1.8, 培养 28 d 菌落数也呈下降趋势, 未增加。可看出药物对真菌的抑制作用不如细菌, 有少量真菌存在, 但依然满足要求。3 种样品抑菌剂系统有效, 能保证药品不易受微生物污染, 安全有效, 建议在处方中对防腐剂的最小有效量或对种类另作考察, 以确保该药在使用过程中安全、有效。

3 讨论

药品在使用和保存过程中有可能被空气中的微生物污染, 进而产生安全隐患。抑菌剂是药物制剂中常见的一种附加剂, 企业在开发阶段都必须确认药品中抑菌剂的抑菌效力。近年来, 国产制剂抑菌剂滥用问题越来越受关注。2010 年版《中国药典》首次收载了抑菌效力检查法, 制定了控制标准和检测方法, 2015 年版《中国药典》对抑菌效力检查法做了很大调整。现有文献主要着眼于眼用制剂抑菌剂抑菌效力的检查^[8-9], 其他剂型抑菌效力检测方法的探讨目前较少^[10]。本研究依据药典方法对 3 种中药口服液体剂进行了加菌试验, 比较试验菌在样品中的存活率, 以探讨样品的抑菌效力, 对生产企业研发阶段抑菌浓度的确定有一定参考价值^[11]。

参考文献:

- [1] 秦玉蕊, 张丽华. 中药口服液选方和工艺分析[J]. 时珍国医国药, 2001, 12(9): 839.
- [2] 胡立荣, 欧阳波, 文晓柯. 中药制剂生产中的微生物污染途径及控制[J]. 中国药事, 2015, 29(6): 613-617.
- [3] 马颖. 关于中药制剂的微生物污染相关因素研究[J]. 健康前沿, 2016, 23(10): 197.
- [4] 郑笠. 甘安合剂与复方甘草口服溶液抑菌效力检测分析[J]. 福建医药杂志, 2016, 38(3): 57-59.
- [5] 张冕, 徐晓洁, 张乃斌, 等. 展筋活血药酒抑菌效力测定和评价[J]. 药学研究, 2017, 36(2): 81-83.
- [6] 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.
- [7] 杨晓莉, 贺聪莹, 绳金房, 等. 中国药典 2015 年版抑菌效力检查法解读[J]. 中国药师, 2016, 19(9): 1740-1742.
- [8] 周剑. 托吡卡胺滴眼液的抑菌效力测定[J]. 中国药业, 2016, 25(10): 69-71.
- [9] 刘广楨, 张媛媛, 冷佳蔚, 等. 四磨汤合剂中抑菌剂的抑菌效力评价[J]. 中国现代应用药学, 2017, 34(2): 232-234.
- [10] 刘峰, 孟蕾蕾, 王国平, 等. 氟康唑滴眼液抑菌剂浓度筛选和抑菌效力研究[J]. 中国药师, 2017, 20(2): 362-364.
- [11] 沈秋莲, 杨育儒, 王庆芬, 等. 枸橼酸钾溶液中抑菌剂的抑菌效果观察[J]. 安徽医药, 2017, 21(4): 623-626.

(收稿日期: 2019-03-05)

本栏目由

国药控股云南有限公司

协办