

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2020.13.019

不同厂家十滴水微生物限度检查方法的验证与评价

胡 翮, 郭 沛, 何 硕, 李 昂[△]

(湖南省湘潭市食品药品检验所, 湖南 湘潭 411100)

摘要:目的 按2015年版《中国药典(一部)》要求,对5个不同厂家十滴水制剂的微生物限度检查方法进行验证,确认所采用的检查方法是否适用于该产品的微生物检查。方法 采用5种试验菌株测试其回收率,验证其是否具有抑菌作用。结果 5个厂家的产品均有一定的抑菌作用,且不同厂家的抑菌程度有一定差异,应采用合适的方法进行微生物检查。结论 方法验证试验可为建立合理的微生物限度检测方法提供参考。

关键词:微生物限度检查;验证;抑菌作用;十滴水

中图分类号:R932;R286.0

文献标识码:A

文章编号:1006-4931(2020)13-0068-03

Verification and Evaluation of the Microbial Limit Test for Shidishui from Different Manufacturers

HU He, GUO Pei, HE Shuo, LI Ang

(Xiangtan Institute for Food and Drug Control, Xiangtan, Hunan, China 411100)

Abstract: Objective To verify the microbial limit test method for Shidishui preparation from 5 different manufacturers according to the requirements of *Chinese Pharmacopoeia* (Volume I, 2015 edition), and to confirm whether the test method is suitable for the microbial test of the product. **Methods** Five samples were used to test the recovery rate and verify bacteriostasis. **Results** All products from the 5 manufacturers had certain bacteriostasis, and the degree of bacteriostasis varied among different manufacturers. Appropriate methods should be adopted for microbiological examination. **Conclusion** The method validation test provides a reference for establishing a reasonable microbial limit test method.

Key words: microbial limit test; verification; bacteriostasis; Shidishui

十滴水是生活中常见的祛暑药,由樟脑、干姜、大黄、小茴香、肉桂、辣椒等组方,主要用于伤暑引起的头晕、恶心、腹痛、胃肠不适等^{[1]449}。由于药品的微生物检测结果受多种因素影响,考虑到该类药品本身的抑菌性和不同厂家生产工艺的差异,故建立经过验证适宜的微生物检验方法十分必要。根据2015年版《中国药典(一部)》的要求,本研究中对5个不同厂家十滴水的微生物检验方法进行了验证试验,为建立合适的微生物检验方法提供参考,并对不同厂家的产品抑菌性及验证结果予以评价。现报道如下。

1 仪器、试剂与菌株

仪器:BL-100G型立式压力蒸汽灭菌器(上海博讯实业有限公司);HF-safe-1200LC型生物安全柜(上海力申科学仪器有限公司);XY600-1B型电子天平(常州幸运电子设备公司,精度为0.1g);SPX-250型生化培养箱(天津泰斯特仪器有限公司);MJX-250B型霉菌培养箱(天津泰斯特仪器有限公司)。

试剂:十滴水(A厂,批号为180318;B厂,批号为20180106;C厂,批号为180505;D厂,批号为180412;E厂,批号为180213);胰酪大豆胨琼脂培养基(批号为180427),沙氏葡萄糖琼脂培养基(批号为180912),胰酪大豆胨液体培养基(批号为180820),沙氏葡萄糖液

体培养基(批号为180731),肠道菌增菌液体培养基(批号为180813),紫红胆盐葡萄糖琼脂培养基(批号为180627),麦康凯琼脂培养基(批号为180904),麦康凯液体培养基(批号为180820),氯化钠-蛋白胨缓冲液(pH=7,批号为180820),均购自北京陆桥公司。

菌株:金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) [CMCC(B)26003],铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*) [CMCC(B)10104],枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) [CMCC(B)63501],白色念珠菌(*Candida albicans*) [CMCC(F)98001],黑曲霉菌(*Aspergillus niger*) [CMCC(F)98003],大肠埃希菌(*Escherichia coli*) [CMCC(B)44102],均来自中国医学细菌保藏中心。

2 方法与结果

2.1 常规法验证

取金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、枯草芽孢杆菌、白色念珠菌的新鲜培养物,用10倍0.9%氯化钠溶液稀释成一定浓度的菌悬液。取黑曲霉的新鲜培养物,加入3~5 mL含0.05%聚山梨酯80的无菌0.9%氯化钠溶液,将孢子洗脱。采用适宜的方法吸出孢子悬液置无菌试管内,用含0.05%聚山梨酯80的无菌0.9%氯化钠溶液制成适宜浓度的黑曲霉孢子悬液。

试验组中,以无菌操作取样品10 mL,加氯化钠-

第一作者:胡翮,女,大学本科,副主任药师,研究方向为食品及药品微生物检测,(电子信箱)411849862@qq.com。

[△]通信作者:李昂,男,大学本科,副主任药师,研究方向为药品检验及质量控制,(电子信箱)10653358@qq.com。

蛋白胨缓冲液($\text{pH} = 7.0$)稀释至 100 mL,制成 1:10 (V/V)的供试液,分别取该供试液 9.9 mL,加入以上 5 种代表试验菌株 0.1 mL(供试液含菌量不大于 100 cfu/mL),吸取 1 mL,注入平皿中,平行制备 2 个平皿,倾注 15~20 mL 融化并冷却至约 45 °C 的琼脂培养基(加入铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌的平皿倾注胰酪大豆胨琼脂培养基;加入白色念珠菌和黑曲霉的平皿倾注沙氏葡萄糖琼脂培养基),待凝固后置规定温度培养并观察结果。供试品对照组中,取供试液,以相应稀释液代替菌液同试验组操作。菌液对照组中,取相应稀释液替代供试液,按试验组操作方法加入试验菌液,并进行微生物回收试验。结果见表 1。

表 1 各批样品需氧菌总数、霉菌和酵母菌总数计数的常规法验证结果(%)

厂家	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
A	10.3	15.5	12.7	20.0	24.2
B	41.9	38.2	45.9	35.7	37.7
C	12.0	10.3	18.6	45.6	30.7
D	15.3	13.9	17.6	49.6	43.5
E	30.6	27.6	31.7	34.8	37.6

可见,5 个厂家的供试品分别接种 5 种试验菌后,需氧菌总数和霉菌酵母菌总数计数的回收率均小于 50%,说明产品有抑菌作用,且 A,C,D 3 个厂家的抑菌作用更强。因此,调整试验方案,对 A,C,D 3 个厂家直接用薄膜过滤法进行验证,对 B,E 2 个厂家的微生物计数采用培养基稀释法进行验证。

2.2 培养基稀释法验证

试验组中,分别取 B 厂和 E 厂的 1:10 (V/V)供试液各 9.9 mL,加入 5 种代表试验菌株 0.1 mL(每 1 mL 供试液中含菌量不大于 100 cfu),吸取该供试液 0.2 mL 注入平皿中,加入 15~20 mL 营养琼脂培养基,待凝固后,置规定温度培养、观察,并进行菌数计数。供试品对照组中,取制备好的供试液,以相应稀释液代替菌液同试验组操作。菌液对照组中,以相应稀释液代替供试液,按试验组操作方法加入试验菌液,并进行微生物回收试验。结果见表 2。可见,使用培养基稀释法仍有部分菌株回收率未达 50%。

表 2 各批样品需氧菌总数、菌和酵母菌总数计数的培养基稀释法验证结果(%)

厂家	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
B	45.1	39.9	47.7	39.6	50.1
E	51.2	48.7	39.5	51.1	53.6

2.3 薄膜过滤法验证

试验组中,取适量氯化钠-蛋白胨缓冲液($\text{pH} = 7.0$)润湿滤膜,将 5 个不同厂家的 1:10 (V/V)供试液

各 9.9 mL 加入滤器中,分别以氯化钠-蛋白胨缓冲液($\text{pH} = 7.0$)100,200,300 mL 作为冲洗液,分次冲洗滤膜,在最后 1 次冲洗液中加入 0.1 mL 不大于 100 cfu 的待测菌株,冲洗后取出滤膜,贴于规定的培养基上培养,并观察和计数。供试品对照组中,取 1:10 (V/V)供试液 10 mL 加入滤器中,分别以氯化钠-蛋白胨缓冲液($\text{pH} = 7.0$)100,200,300 mL 作为冲洗液,分次冲洗后,取出滤膜,贴于规定的培养基上培养,并观察和计数。菌液对照组中,取相应稀释液代替供试液,按试验组操作方法加入试验菌液,并进行微生物回收试验。结果见表 3。

表 3 各批样品需氧菌总数、霉菌和酵母菌总数计数的薄膜过滤法验证结果(%)

冲洗量	厂家	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
100 mL	A	57.9	39.4	51.3	58.8	64.5
	B	45.9	48.2	49.8	84.9	70.8
	C	26.0	43.8	42.5	75.6	70.7
	D	35.3	28.9	40.6	79.6	81.5
	E	34.6	41.8	50.7	74.2	67.6
200 mL	A	67.9	45.5	53.1	68.8	84.5
	B	75.9	68.2	80.9	89.2	77.7
	C	38.0	48.3	50.1	76.8	83.6
	D	69.5	48.5	69.5	80.6	84.3
	E	66.6	47.6	71.7	77.8	69.3
300 mL	A	80.6	79.4	71.3	88.8	84.5
	B	95.9	89.7	91.4	94.9	90.3
	C	70.4	73.9	82.5	85.6	83.7
	D	86.7	88.0	90.6	84.4	89.5
	E	92.6	88.1	91.5	94.2	87.0

可见,5 个不同厂家的样品经不同体积冲洗液薄膜过滤后,不同菌株之间验证结果存在一定差异。当冲洗量为 100 mL 时,各厂家均不能达到规定的回收率,说明样品仍有一定的抑菌作用。当冲洗量为 200 mL 时,B 厂样品 5 种菌株的回收率均高于 50%,说明可用此经过验证的方法用于该厂家的需氧菌总数、霉菌和酵母菌总数计数,而其他厂家还应适量扩大冲洗量。当冲洗量达到 300 mL 时,5 个厂家产品对 5 种试验代表菌株的回收率均能达到 50% 以上。

2.4 控制菌检查方法验证

试验组中,将 5 个不同厂家的 1:10 (V/V)供试液各 9.9 mL 加入滤器中,B 厂的以氯化钠-蛋白胨缓冲液($\text{pH} = 7.0$)200 mL 作为冲洗液,A,C,D,E 厂的以氯化钠-蛋白胨缓冲液($\text{pH} = 7.0$)300 mL 作为冲洗液,分次冲洗滤膜,在最后 1 次冲洗液中加入 0.1 mL 不大于 100 cfu 的大肠埃希菌,冲洗后取出滤膜,贴于规定的培养基上培养并观察结果。阳性对照组中,取相应稀释液代替供试液,按试验组中方法试验,在最后 1 次冲洗液中加入

不大于 100 cfu 的大肠埃希菌,冲洗后取出滤膜,贴于规定的培养基上培养并观察结果。阴性对照组中,取相应稀释液代替供试液,按试验组中方法进行薄膜过滤,但不加菌液,待冲洗完成后取出滤膜,贴于规定的培养基上培养并观察。结果见表 4。

表 4 大肠埃希菌验证结果

厂家	试验组	阳性对照组	阴性对照组
A	+	+	-
B	+	+	-
C	+	+	-
D	+	+	-
E	+	+	-

注:“+”表示生长浑浊;“-”表示未生长。

3 讨论

3.1 验证结果

本研究结果显示,常规法和培养基稀释法均不适用于该 5 个厂家十滴水的微生物限度及控制菌检查;采用薄膜过滤法后,各厂家的各试验菌的回收率均符合要求。可见,A,C,D 3 个厂家的供试液常规法试验的抑菌作用相对较强,回收率非常低,故直接采用薄膜过滤法。B,E 2 个厂家的供试液经培养基稀释法验证后,有部分菌株不能达到规定的回收率标准,故将 5 个厂家的产品均进行薄膜过滤法试验。除 B 厂的供试液冲洗量为 200 mL 时可满足试验要求外,其他厂家的供试液所用稀释液冲洗量均为 300 mL 才能去除其抑菌作用。因此,因各厂家的产生环境、制备工艺、原辅料质量及供试品的理化特性等可能存在差异,对微生物限度检查的产品均应进行方法验证,以确认所采用方法适用于该产品的微生物检查。

3.2 验证方法选择

按 2015 年版《中国药典(一部)》要求,选择适宜的阳性菌株^[11]¹⁴⁰,对 5 个不同厂家的样品同时进行验证与比较。优先考虑常规法验证,若验证结果不能满足试验要求,对于抑菌作用相对较强的,采用培养基稀释法再验证;而对于抑菌作用很强的,则考虑采用薄膜过滤法来消除其抑菌作用。参考文献[2-7]进行比较和研究,对试验方案进行设计和调整,文中验证思路和试验方法可对该品种微生物检查方法的验证提供参考,以提高微生物的检出率,更好地控制药品的质量。

3.3 验证过程中应注意的问题

菌液:制备试验菌液时,应提前确定菌液浓度,进行菌数测定,并与试验组菌数测定同时进行,精确测定菌数是回收率测定的关键步骤。由于加入菌液体积较小,对检测结果影响较大,因此必须严格控制菌液加入量,有必要采用商品化的定量菌株^[8]。试验要求的加菌量一

般不大于 100 cfu,以便于计数,菌量太大或太小均可能导致误差增加。

样品:样品的微生物限度检查验证试验应进行 3 次独立的平行试验。样品稀释后应混合均匀^[9]。此外,采用薄膜过滤法时,冲洗时应分次冲洗,且冲洗量不宜过大,总冲洗量不得超过 1 000 mL,以免滤膜上的微生物受损伤^[12]。

培养基与培养时间:试验用培养基可按 2015 年版《中国药典(四部)》非无菌产品微生物限度检查法中培养基适用性检查项下进行验证试验,以确保检测结果的准确性。此外,在适宜培养条件下,微生物的群体生长数量与培养时间遵循生长曲线规律^[10],处于指数生长期的代谢旺盛,生长迅速,个体形态、生化特征较一致,是微生物检验鉴定的理想状态^[11],尤其当菌落在培养基上不宜辨别时,可适当延长培养时间,有利于微生物的检出^[12]。

滤膜:本研究中对比了 2 个厂家的不同型号滤膜,发现有的滤膜不能起到很好的过滤作用。因十滴水的主要溶剂为 70% 乙醇,应充分考虑滤膜材质对溶剂兼容性和滤膜对微生物截留能力的影响。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015.
- [2] 薛坤. 我国微生物限度检查方法验证研究概况[J]. 中国城乡企业卫生,2008(2):91-93.
- [3] 陈晓平,王新财. 微生物限度检查法计数方法验证的解析[J]. 中国药业,2006,15(13):52-53.
- [4] 吴晓敏,王燕燕. 8 种医院制剂微生物限度检查方法验证[J]. 中国医院药学杂志,2007,27(1):93-94.
- [5] 殷建国. 微生物限度检查应注意的若干问题[J]. 中国药事,2004,18(7):456.
- [6] 陈万胜. 药品微生物限度检验误差影响因素分析[J]. 中国当代医药,2011,18(4):121.
- [7] 汪穗福. 微生物检测验证技术[M]. 北京:中国医药科技出版社,2005:118-119.
- [8] 解慧. 金黄色葡萄球菌定量质控菌株的制备及其在检验工作中的应用[J]. 天津药学,2018,30(5):7-10.
- [9] 肖莉. 论述微生物限度检查中供试液的匀细程度对细菌数测定的影响[J]. 中国药师,2002,5(12):734-735.
- [10] 杨晓莉,李辉,马英英,等. 《中国药典》2015 年版非无菌产品微生物限度检查:控制菌检查法解读与对策[J]. 中国药师,2016,19(4):748-752.
- [11] 贾俊涛,梁成珠,马维兴. 食品微生物检测工作指南[M]. 北京:中国质检出版社,中国标准出版社,2012:139.
- [12] 杨晓莉,李辉,绳金房,等. 中、英、美、欧药典制药用水微生物检查法对比研究[J]. 西北药学杂志,2016,28(5):515-517.

(收稿日期:2020-01-16)