

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2021.18.021

小建中胶囊微生物限度检查方法学研究

刘艳平,张秀花[△],刘靖华

(山东省菏泽市食品药品检验检测研究院,山东 菏泽 274000)

摘要:目的 探讨小建中胶囊的微生物限度检查方法。方法 分别采用微生物计数法中的常规法和稀释法对5种常见菌进行试验。结果 小建中胶囊对铜绿假单胞菌和枯草芽孢杆菌均有较强的抗菌活性,当样品稀释至80倍时,各试验菌回收比均在0.5~2.0;控制菌常规检查法能检出阳性菌。结论 稀释法可用于小建中胶囊微生物限度检查,常规法可用于制剂控制菌的检查。

关键词:小建中胶囊;微生物限度检查;稀释法;常规法

中图分类号:R927.1

文献标志码:A

文章编号:1006-4931(2021)18-0082-03

Methodology Study of Microbial Limit Test of Xiaojianzhong Capsules

LIU Yanping, ZHANG Xiuhua, LIU Jinghua

(Heze Institute of Food and Drug Inspection, Heze, Shandong, China 274000)

Abstract: Objective To establish a method for microbial limit test of Xiaojianzhong Capsules. **Methods** Five common bacteria were tested by the routine method and dilution method in the microbial counting method. **Results** Xiaojianzhong Capsules had strong antibacterial activity against *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus subtilis*. When the sample was diluted to 80 times, the recovery ratio of all tested bacteria was in the range of 0.5-2.0. Positive bacteria could be detected by the routine test of control bacteria. **Conclusion** The dilution method can be used to the microbial limit test of Xiaojianzhong Capsules, and the routine method can be used to test the control bacteria in the preparation.

Key words: Xiaojianzhong Capsules; microbial limit test; dilution method; routine method

小建中胶囊由桂枝、白芍、炙甘草、生姜、大枣等5味中药经现代工艺精制而成,具有温中祛寒、缓急止痛功效^[1]。标准制法中桂枝以水蒸气蒸馏提取挥发油入

药,具有明显的抗菌活性^[2-5],配方中白芍、生姜等亦具有一定抑菌作用^[6-10],进行微生物限度检查时,需首先消除样品本身的抑菌作用,才能使被检微生物正常繁殖^[11]。

第一作者:刘艳平,女,大学本科,副主任中药师,研究方向为药品检验,(电子信箱)lyp69100427@163.com。

[△]通信作者:张秀花,女,大学本科,副主任药师,研究方向为药品微生物检验,(电子信箱)zhangxiuhua2011@126.com。

厚朴酚含量。该方法前处理条件简便、快捷,所建立的梯度洗脱方法灵敏、准确,测定结果稳定可靠,重复性好,适用性强,实现了多成分控制沉香化滞丸的质量。

参考文献

- [1] WS₃-B-1748-94,中华人民共和国卫生部药品标准·中药成方制剂(第九册)[S].
- [2] 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,2020:1060.
- [3] 张顺平,张顺吉. 消化胶囊中7个成分的测定[J]. 中国医药工业杂志,2017,10(48):1489-1492.
- [4] 杨佳静,薛佳,周华芳,等. HPLC法同时测定胃苏颗粒中柚皮苷、橙皮苷和新橙皮苷的含量[J]. 中国药房,2014,25(4):372-374.
- [5] 郭琪,王海波,李向阳,等. HPLC法同时测定利胆排石片中14个成分的含量[J]. 药物分析杂志,2017,37(4):631-638.
- [6] 王晓玲,赵力辉. HPLC法同时测定香连化滞丸中10种成分[J]. 中草药,2015,46(21):3190-3193.
- [7] 吕萍,张娜,张振巍,等. 清热解毒口服液 HPLC 指纹图谱及4种主要成分的含量分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(2):98-101.
- [8] 杨跃华,胡春丽,张洪霞,等. RP-HPLC法同时测定利胆排

石片中5种有效成分的含量[J]. 沈阳药科大学学报,2012,29(5):373-377.

- [9] 毕秋左,钱洲. 高效液相色谱法同时测定肝达康颗粒中5种成分含量[J]. 中国药业,2020,29(19):49-51.
- [10] 吕青林,冯锋. 枳实与青皮主要化学成分对比研究[J]. 北方药学,2013,10(5):8-9.
- [11] 彭艺飞,李佳霖. 高效液相色谱法测定苏佛顺气颗粒中橙皮苷含量[J]. 中国药业,2020,29(15):62-63.
- [12] 王丽琼,吴丽. HPLC法快速测定五种含厚朴制剂中和厚朴酚与厚朴酚的含量[J]. 亚太传统医药,2020,16(5):59-62.
- [13] 贾丽华,魏鸿雁. 枳壳水提液三种黄酮成分含量比较研究[J]. 新疆中医药,2014,32(6):45-47.
- [14] 唐乔. HPLC法测定百咳静颗粒中8个成分的含量[J]. 药物分析杂志,2021,41(1):147-153.
- [15] 徐向恩,朱爱丽,薛金龙,等. 大黄中芦荟大黄素等5种蒽醌成分含量测定方法探索研究[J]. 中国药品标准,2021,22(1):84-88.
- [16] 缪红,徐丹洋,苏健. 大黄泻火散质量标准改进研究[J]. 中国药业,2018,27(23):19-23.

(收稿日期:2020-11-23;修回日期:2021-03-18)

本研究中采用3批样品进行方法适用性试验,建立了小建中胶囊的微生物限度检查方法。现报道如下。

1 仪器、试药与菌株

1.1 仪器

HZT-A600型电子天平(福州华志科学仪器有限公司);MLS-3781L-PC型高压蒸汽灭菌器(三洋工业株式会社);Class II BSC型生物安全柜(新加坡 ESCD 公司);WGZ-2XJ型细菌浊度分析仪(上海昕瑞仪器仪表有限公司);DHP-420型电热恒温培养箱(北京市永光明医疗仪器厂);SPX-150B型生化培养箱(上海博泰实验设备有限公司)。

1.2 试药

小建中胶囊(贵州太和制药有限公司,批号分别为20190801,20200501,20200301);胰酪大豆胨琼脂培养基(TSA,批号为190518),胰酪大豆胨液体培养基(TSB,批号为190712),沙氏葡萄糖琼脂培养基(SDA,批号为190625),pH 7.0 无菌氯化钠蛋白胨缓冲液(批号为190206),均购自北京陆桥技术股份有限公司。

1.3 菌株

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[CMCC(F)98003]、大肠埃希菌[CMCC(B)44102],均购自广东环凯微生物科技有限公司,试验所用菌株均为第3代。

2 方法与结果

2.1 溶液制备

菌液: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pH 7.0 无菌氯化钠蛋白胨缓冲液制成菌落数不大于 1×10^4 cfu/mL的菌悬液;取黑曲霉的新鲜培养物,再用含0.05%聚山梨酯80的pH 7.0 无菌氯化钠蛋白胨缓冲液制成菌落数不大于 1×10^4 cfu/mL的菌悬液;取大肠埃希菌,用pH 7.0 无菌氯化钠蛋白胨缓冲液制成菌落数不大于100 cfu/mL的菌悬液^[12]。

供试品溶液:取样品内容物10 g,加pH 7.0 无菌氯化钠蛋白胨缓冲液溶解并稀释至100 mL,混匀,制成1:10(m/V)供试品溶液;用pH 7.0 无菌氯化钠蛋白胨缓冲液制成1:20(m/V),1:50(m/V),1:80(m/V)的系列供试品溶液^[13]。

2.2 微生物检查常规法

试验组:取2.1项下1:10的供试品溶液适量,分别置5支无菌试管,每管9.9 mL,分别加入2.1项下5种菌悬液0.1 mL,混匀,各取1 mL注入平皿,平行2份。

空白对照组:取2.1项下1:10的供试品溶液适量,置无菌管,每管9.9 mL,分别加入试验组对应的稀

释液0.1 mL,混匀,各取1 mL注入平皿,平行2份。

菌液对照组:取试验组对应的稀释液分装于无菌试管中,每管9.9 mL,分别加入2.1项下5种菌悬液0.1 mL,混匀,各取1 mL注入平皿,平行2份。

试验菌加样回收测定:取上述3组平皿,需氧菌计数中,金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、枯草芽孢杆菌在32~33℃条件下用TSA培养72 h;白色念珠菌、黑曲霉在33~35℃条件下用TSA培养5 d;霉菌酵母菌计数中,白色念珠菌、黑曲霉在23~25℃条件下用SDA培养5 d^[12]。按公式计算回收比,回收比=(试验组菌落数-空白对照组菌落数)/菌液对照组菌落数。结果需氧菌计数中,铜绿假单胞菌及枯草芽孢杆菌回收比均小于0.5,详见表1(表中“铜绿”为铜绿假单胞菌,“枯草”为枯草芽孢杆菌,“金葡”为金黄色葡萄球菌,“白念”为白色念珠菌,表2、表4同)。可见,常规法不能消除样品中抑菌成分,需进一步试验。

表1 常规法试验菌株回收比($n=3$)

Tab.1 Recovery ratio of test strains by the routine method($n=3$)

样品 批号	需氧菌					霉菌酵母菌	
	铜绿	枯草	金葡	白念	黑曲霉	白念	黑曲霉
20191001	0.26	0.16	0.86	0.95	0.92	0.98	0.95
20190801	0.22	0.15	0.90	0.96	0.96	0.99	0.96
20200202	0.23	0.18	0.88	0.92	0.90	0.96	0.98

2.3 微生物检查稀释法

试验组:取2.1项下1:20(m/V)的供试品溶液,分别置2支无菌试管中,每管9.9 mL,分别加入2.1项下铜绿假单胞菌、枯草芽孢杆菌2种菌悬液0.1 mL,混匀,各取1 mL注入平皿,平行制备2份。同法制备1:50(m/V),1:80(m/V)溶液。

供试品对照组:取2.1项下1:20(m/V)的供试品溶液9.9 mL,置无菌试管中,加入pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液0.1 mL,混匀,取1 mL注入平皿,平行制备2份。同法制备1:50(m/V)和1:80(m/V)供试品。

菌液对照组:同常规法“菌液对照组”项下方法制备铜绿假单胞菌、枯草芽孢杆菌2种菌液对照组。同法制备1:50(m/V)和1:80(m/V)菌液。

试验菌加样回收测定:按2.2项下方法操作。1:20供试液,1批样品铜绿假单胞菌、3批样品枯草芽孢杆菌回收比均小于0.5;1:50供试液,2批样品枯草芽孢杆菌回收比均小于0.5;1:80供试液,3批样品2种菌株回收比均在0.5~2.0范围内,符合药典要求。详见表2。

2.4 控制菌检查

供试品组(A组):取2.1项下1:10(m/V)供试品溶液3份,每份10 mL,分别置100,150,200 mL TSB中。

阳性对照组(B组):取2.1项下1:10(m/V)供试

表2 稀释法试验菌株回收比($n=3$)

Tab. 2 Recovery ratio of test strains by the dilution method($n=3$)

样品 批号	1:20 供试液		1:50 供试液		1:80 供试液	
	铜绿	枯草	铜绿	枯草	铜绿	枯草
20191001	0.46	0.30	0.96	0.48	0.98	0.98
20190801	0.53	0.28	0.88	0.44	0.96	0.96
20200202	0.51	0.32	0.93	0.56	0.98	0.98

品溶液3份,每份10 mL,分别置100,150,200 mL TSB中,分别加入2.1项下大肠埃希菌菌液1 mL。

阴性对照组(C组):以稀释液代替供试品溶液,其余同A组。

控制菌检查:上述3组均在33~35℃条件下培养24 h^[14]。结果B组均检出阳性菌,说明小建中胶囊对大肠埃希菌无抑制作用。详见表3。

表3 不同培养基体积控制菌检查结果($n=3$)

Tab. 3 Results of control bacteria test in different medium volume($n=3$)

样品 批号	100 mL TSB			150 mL TSB			200 mL TSB		
	A组	B组	C组	A组	B组	C组	A组	B组	C组
20191001	-	+	-	-	+	-	-	+	-
20190801	-	+	-	-	+	-	-	+	-
20200202	-	+	-	-	+	-	-	+	-

注: + 表示检出阳性菌, - 表示未检出阳性菌。

Note: + indicates positive bacteria were detected, - indicates no positive bacteria were detected.

2.5 微生物限度检查法适用性验证

对样品进行微生物限度检查法适用性验证。结果,微生物计数采用1:80供试品溶液,3批样品5种菌株回收比均在0.5~2.0范围内;控制菌检查采用常规法,阳性对照组检出阳性菌,符合药典要求。详见表4。

表4 微生物限度检查法适用性验证试验结果(平均回收比)

Tab. 4 Results of applicability verification test of microbial limit test method(average recovery ratio)

样品 批号	需氧菌					霉菌酵母菌	
	铜绿	枯草	金葡	白念	黑曲霉	白念	黑曲霉
20191001	0.98	0.95	1.01	0.95	0.96	0.98	0.96
20190801	0.96	0.97	0.96	0.98	0.97	0.96	0.97
20200202	0.95	1.10	0.97	0.99	0.99	1.10	0.96

3 讨论

药品微生物限度检查是药品管理体系中的一个重要环节,药品受微生物污染程度直接反映药品生产、运输、销售、贮藏等环节的质量管理是否规范。对药品中污染的微生物进行控制,建立适宜的药品微生物限度检查方法,可最大限度地保证公众用药安全有效。微生物菌落总数回收比应在0.5~2.0之间,回收比小于0.5时,

可采用稀释法,加入适宜的中和剂或灭活剂,薄膜过滤法,以及联合应用上述方法可消除供试品的抑菌活性。微生物限度检查方法建立的关键点是采用何种技术手段消除样品中的抑菌成分,且操作方法科学、简便、快速。

本研究中的样品有明显抑菌作用,将常规法回收比小于0.5的铜绿假单胞菌、枯草芽孢杆菌作为敏感菌株,采用稀释法、1:80供试液,各试验菌回收比均在0.5~2.0之间,符合药典要求,故可用于小建中胶囊微生物计数检查。采用常规法和稀释法同时进行大肠埃希菌检查,结果表明,小建中胶囊对大肠埃希菌无抑制作用,常规法可用于其控制菌的检查。

本研究中根据制剂的抑菌特性,采用稀释法对需氧菌、霉菌酵母菌及常规法对大肠埃希菌进行验证,方法可行、结果可靠,可用于该产品微生物限度检查的质量控制,同时为药监部门科学监管提供一定的技术参考。

参考文献

- [1] WS₃-209(X-199)-2000(Z),国家药品标准·新药转正标准(第二十七册)[S].
- [2] 韩爱霞,蔡跃花,邱世翠,等. 桂枝体外抑菌作用研究[J]. 时珍国医国药,2004,25(11):743.
- [3] 王 喆,赵晨宇,蒋圆婷,等. 桂枝挥发油杀菌活性及抑菌机制研究[J]. 食品科技,2019,44(11):251-258.
- [4] 陈海鹰,范正达,朱珊梅,等. 一种中药空气消毒剂中挥发油的抑菌活性研究[J]. 今日药学,2017,27(1):26-29.
- [5] 徐旭红,唐风雷,范正达,等. 几种中药挥发油挥发剂空间抗菌作用的考察[J]. 现代中西医结合杂志,2010,19(21):2618.
- [6] 陈 莉,朱凤静,张春枝. 30种中药水提取物的体外抗菌活性试验[J]. 大连轻工业学院学报,2005,24(4):269-271.
- [7] 吴培源,俞晓红,谢建生. 四物汤抗氧化活性及抗菌活性研究[J]. 光明中医,2017,32(16):2339-2340.
- [8] 宋 力,何 永,张雪兵,等. 生姜中多酚的提取及其抑菌性研究[J]. 信阳师范学院学报(自然科学版),2017,30(3):445-448.
- [9] 国 权,郭艳华,王伟志. 生姜与枸橼酸复合物的抑菌效果探讨[J]. 江汉大学学报(自然科学版),2011,39(1):100-103.
- [10] 李田叶,刘卫华,梁 娜,等. 评估生姜及其不同炮制品中姜辣素和其抗氧化活性[J]. 食品工业,2016,37(12):180-183.
- [11] 雷洪涛,刘敏彦,欧阳竞峰,等. 连花清瘟胶囊抗金黄色葡萄球菌生物膜研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(22):161-164.
- [12] 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,2020:160-170.
- [13] 中国食品药品检定研究院. 中国药品检验标准操作规范[M]. 北京:中国医药科技出版社,2019:441.

(收稿日期:2020-11-27;修回日期:2021-03-10)