

◇ 药物分析 ◇

倍芪腹泻贴微生物限度检查方法的适用性试验

卫延明, 闵朕, 陈子龙, 杜思迪, 秦亚红

(陕西省渭南市食品药品监督管理局, 陕西 渭南 714000)

摘要:目的 建立倍芪腹泻贴微生物限度检查方法。方法 按照《中国药典》2015年版四部〔通则1105和通则1106〕的具体规定,采用平皿法、稀释法、薄膜过滤法及方法联用对倍芪腹泻贴进行微生物限度方法适用性试验。结果 需氧菌总数、真菌和酵母菌总数计数方法适用性试验中各试验菌回收比值均不小于0.9,控制菌方法适用性试验均检出金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌。结论 该试验方法可用于倍芪腹泻贴的微生物限度检查。

关键词:集落计数;微生物;中药药剂学;五倍子;黄芪

doi:10.3969/j.issn.1009-6469.2018.10.006

Research on applicability test of microbial limit determination for Beiqi Fuxie Tie

WEI Yanming, MIN Zhen, CHEN Zilong, DU Sidi, QIN Yahong

(Weinan Institute for Food and Drug Control of Shaanxi Province, Weinan, Shaanxi 714000, China)

Abstract: Objective To establish method for the microbial limit test of Beiqi Fuxie Tie. **Methods** According to the guiding principle of the applicability test of microbial limit count method provided by the Chinese Pharmacopoeia (edition 2015, part 4), the microbial limit test of Beiqi Fuxie Tie was conducted using the normal plate method, the dilution method, the membrane filtration method and the union of some test methods. **Results** The total number of aerobic bacteria, the total number of molds and yeast count methods the recovery ratio of each test bacterium was not less than 0.9, and the applicability test of control bacterium method detected staphylococcus aureus and pseudomonas aeruginosa. **Conclusions** The established method could apply to the microbial limit test of Beiqi Fuxie Tie.

Key words: Colony count; microbial; Pharmaceutics (TCD); *Galla chinensis*; Immunomodulation

倍芪腹泻贴是一种含药材原粉的中药制剂,其主要成分为五倍子、黄芪、肉桂和木香,具有收涩敛肺、补气健脾、益肾助阳的功效,主要用于脾肺气虚、脾肾阳虚所致的腹泻,自汗,盗汗及遗尿的辅助治疗。倍芪腹泻贴处方中黄芪的主要有效成分为黄芪多糖和黄芪皂苷,其中黄芪皂苷对金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、铜绿假单胞菌都有明显的抑菌作用。本文按照《中国药典》2015年版四部〔通则1105和通则1106〕的具体要求^[1],建立倍芪腹泻贴的微生物限度检查方法。

1 仪器与材料

1.1 仪器 MJ-II型真菌培养箱(上海一恒科技有限公司),SPX-150型生化培养箱(上海金慧科电子有限公司),SPX-250B-Z型生化培养箱(上海博迅实业有限公司医疗设备厂),HTY-2000集菌仪(杭州高得医疗器械有限公司)。

1.2 样品及试剂 倍芪腹泻贴(陕西海普药业有限公司生产,批号20160901,规格:每贴重1.5g);培养基:胰酪大豆胨液体培养基、胰酪大豆胨琼脂

培养基、沙氏葡萄糖液体培养基、沙氏葡萄糖琼脂培养基、麦康凯液体培养基、麦康凯琼脂培养基、pH7.0无菌氯化钠蛋白胨缓冲液、蛋白胨;氯化钠和吐温80。冲洗液:0.1%无菌蛋白胨水溶液。

1.3 试验菌种 铜绿假单胞菌[CMCC(B)10104];金黄色葡萄球菌[CMCC(B)26003];枯草芽孢杆菌[CMCC(B)63501];白色念珠菌[CMCC(F)98001];黑曲霉[CMCC(F)98003]均由青岛高科园海博生物技术有限公司提供。

菌液制备:分别取金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、铜绿假单胞菌的瓷珠1粒至10mL的胰酪大豆胨液体培养基中,35℃培养24h。将金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌的培养物用0.9%无菌氯化钠溶液制备成适宜浓度的菌悬液;再将枯草芽孢杆菌的培养物接种至胰酪大豆胨琼脂斜面培养基上,35℃培养7d,然后加入5mL0.9%无菌氯化钠溶液进行适当振摇,并于65℃水浴中加热30min,取该培养物1mL,用0.9%无菌氯化钠溶液制备成适宜浓度的菌悬液。

取白色念珠菌的瓷珠 1 粒至 10 mL 的沙氏葡萄糖液体培养基中,25 ℃ 培养 48 h,用 0.9% 无菌氯化钠溶液制备成适宜浓度的菌悬液;取黑曲霉的瓷珠 1 粒至 10 mL 的沙氏葡萄糖液体培养基中,25 ℃ 培养 5 d。将上述黑曲霉培养物接种至沙氏葡萄糖琼脂斜面培养基上,25 ℃ 培养 7 d,再加入 5 mL 含 0.05% 吐温 80 的 0.9% 无菌氯化钠溶液进行洗脱,吸取孢子悬液 1 mL,用含 0.05% 吐温 80 的 0.9% 无菌氯化钠溶液制备成适宜浓度的菌悬液^[2-7]。

1.4 供试品溶液的制备 取供试品 6~7 贴(10 g),去掉防粘层,将粘贴面朝上放置于无菌玻璃器皿上,在粘贴面上覆盖一层适宜的无菌纱布,并用灭过菌的剪刀将其剪成小块状,放入含 5% 吐温 80 的 pH7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液 100 mL 中,强力振荡使其溶解^[2],然后用无菌纱布以无菌方式将其过滤到一个无菌玻璃容器中,制备成 1:10 的供试液 A;取 1:10 供试液 40 mL 至上述稀释液 40 mL 中,混匀,制备成 1:20 供试液 B;取 1:10 供试液 20 mL 至上述稀释液 80 mL 中,混匀,制备成 1:50 供试液 C;取 1:10 供试液 10 mL 至上述稀释液 90 mL 中,混匀,制备成 1:100 供试液 D。

2 方法

2.1 计数方法适用性试验

2.1.1 平皿法(1:10、1:20、1:50、1:100) 取相应稀释级别的供试液(A、B、C、D)9.9 mL 和 0.1 mL 的试验菌液,混匀,取混合液 1 mL 置平皿中,立即倾注 15~20 mL 培养基,待凝固后置规定温度培养,需氧菌培养 3 d,真菌和酵母菌各培养 5 d,记录菌落数,作为试验组。其中,5 种需氧菌(枯草芽孢

杆菌、金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、白色念珠菌、黑曲霉)和 2 种真菌和酵母菌(白色念珠菌、黑曲霉)共计 7 个试验组,每个试验组平行制备两个平皿;同法测定相应的试验菌菌落数,作为菌液组;测定供试品的本底菌落数,作为供试品对照组。按照公式计算回收比值:回收比值=(试验组平均菌落数-供试品对照组平均菌落数)/菌液组平均菌落数,结果见表 1。

2.1.2 稀释法(1:100)+薄膜过滤法(方法 1:300 mL,方法 2:500 mL) 取 1:100 供试液 10 mL,采用薄膜过滤法(在第 1 次冲洗液中加入供试液,在最后一次冲洗液中加入小于 100 cfu 的试验菌 0.1 mL),用冲洗液(方法 1:300 mL,方法 2:500 mL)冲洗,每次 100 mL,在最后一次冲洗液中加入小于 100 cfu 的试验菌,滤干,取出滤膜贴于培养基平板上,作为试验组并测定其菌落数;同法测定供试品本底菌落数,作为供试品对照组;菌液组同平皿法。最后按照平皿法公式计算回收比值,结果见表 1。

2.2 控制菌(铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌)检查方法适用性试验

2.2.1 试验组 (1)常规法:取 1:10 供试液 10 mL 和不大于 100 cfu 的试验菌接种至 100 mL 的胰酪大豆胨液体培养基中,依据各试验菌检查项下的方法进行试验,结果见表 2。(2)培养基稀释法(200 mL、400 mL)取 1:10 供试液和不大于 100cfu 的试验菌分别接种至 200 mL 和 400 mL 的胰酪大豆胨液体培养基中,依据各试验菌检查项下的方法进行试验,结果见表 2。(3)薄膜过滤法(方法 1:冲洗

表 1 微生物限度计数方法适用性试验回收比值结果

方法	金黄色葡萄球菌				铜绿假单胞菌				枯草芽孢杆菌				白色念珠菌(x)				黑曲霉(x)				白色念珠菌(m)				黑曲霉(m)			
	1	2	3	\bar{x}	1	2	3	\bar{x}	1	2	3	\bar{x}	1	2	3	\bar{x}	1	2	3	\bar{x}	1	2	3	\bar{x}	1	2	3	\bar{x}
平皿法																												
1:10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.9	1.0	1.1	1.0	1.2	1.0	1.3	1.2	1.2	1.0	1.1	1.1	0.9	0.9	0.9	0.9
1:20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1:50	0	0.1	0.2	0.1	0.2	0.3	0.2	0.2	0.2	0.2	0.3	0.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1:100	0.3	0.3	0.4	0.3	0.3	0.3	0.4	0.3	0.4	0.4	0.3	0.4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
稀释法+薄膜过滤法																												
方法1	0.4	0.4	0.4	0.4	0.3	0.4	0.3	0.3	0.4	0.4	0.4	0.4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
方法2	1.0	1.2	1.1	1.1	0.9	1.1	0.9	1.0	1.3	1.2	1.1	1.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

注: - 表示未进行试验;x 代表需氧菌,m 代表真菌和酵母菌

300 mL,方法 2:冲洗 500 mL)。取 1:20 供试液 20 mL,薄膜过滤,用冲洗液(方法 1:300 mL,方法 2:500 mL)冲洗,每次 100 mL,在第一次冲洗液中加入供试液,在最后一次冲洗液中加入不大于 100 cfu 的试验菌,滤干,转移滤膜至 100 mL 的胰酪大豆胨液体培养基中,依据各试验菌检查项下的方法进行试验,结果见表 2。

2.2.2 阳性对照组 取不大于 100 cfu 的试验菌依据各方法项下的试验组方法进行试验,结果见表 2。

2.2.3 阴性对照组 取稀释液替代供试液,依据各试验菌检查项下的方法进行试验,结果见表 2。

表 2 控制菌检查方法适用性试验结果

方法	控制菌	试验组	阳性 对照组	阴性 对照组
常规法	铜绿假单胞菌	-	+	-
	金黄色葡萄球菌	-	+	-
培养基稀释法 (200 mL)	铜绿假单胞菌	-	+	-
	金黄色葡萄球菌	-	+	-
培养基稀释法 (400 mL)	铜绿假单胞菌	-	+	-
	金黄色葡萄球菌	-	+	-
薄膜过滤法 (方法 1)	铜绿假单胞菌	-	+	-
	金黄色葡萄球菌	-	+	-
薄膜过滤法 (方法 2)	铜绿假单胞菌	+	+	-
	金黄色葡萄球菌	+	+	-

注:“+”代表检出,“-”代表未检出

3 结果

3.1 计数方法试验结果 由表 1 可见,倍芪腹泻贴对三种细菌有很强的抑菌作用,平皿法和薄膜过滤法方法 1 都不适用于需氧菌总数的测定,应采用稀释法(1:100)+薄膜过滤法(500 毫升/膜)进行需氧菌总数的测定;可采用平皿法(1:10)进行真菌和酵母菌总数的测定^[8-9]。

3.2 控制菌检查方法试验结果 常规法、培养基稀释法(200 mL、400 mL)和薄膜过滤法方法 1 的试验组均未检出试验菌(铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌),因此不可用于控制菌铜绿假单胞菌和金黄色葡萄球菌的检查。薄膜过滤法 2(1:20,冲洗 500 mL)的试验组均检出试验菌(铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌),因此可用于控制菌铜绿假单胞菌和金黄色葡萄球菌的检查。见表 2。

4 讨论

4.1 供试液的制备问题 普通贴剂药层薄,面积较大,而且药层下面都粘着一层塑料薄膜,不易进行有效成分的重量称量。因此药典规定贴剂在进行微生物限度检查时,供试液的制备应取 100

cm² 至 100 mL 的稀释液中进行振荡溶解,而不是按照普通方法称取 10 g 至 100 mL 的稀释液中进行制备。但倍芪腹泻贴呈圆柱形,整体外观厚而小,而且操作起来相当不便,并且制备出来的溶液过于黏稠,根本无法吸取^[10-11]。鉴于此,笔者在进行方法适用性试验前,先对该贴剂的标示规格进行了复核,最终确定该药的实际规格约为 1.5 g,也就是说制备 1:10 的供试液,供试品的称样量为 6~7 贴,这大大降低了溶液的黏稠度,为试验的顺利进行打下了良好的基础。

4.2 枯草芽孢杆菌菌悬液的制备问题 枯草芽孢杆菌是需氧芽孢杆菌属,芽孢是其赖以长期存活的主要形式。药典方法培养时间短,芽孢含量较少,菌悬液很不稳定。因此,菌液计数与试验计数结果差别很大,这大大增加了实验室人员的工作量。枯草芽孢杆菌的生活周期包括繁殖期、孢子囊期和芽孢期,要形成芽孢,一般需要在斜面上培养 7 d 左右。因此,笔者首先将枯草芽孢杆菌的培养物接种至胰酪大豆胨琼脂斜面上培养 7 d,然后用稀释液冲下菌苔,并将其放入 65 ℃ 水浴加热 30 min,这样做的目的是使该菌体菌悬液彻底变成芽孢菌悬液,最后再进行稀释计数,而且枯草芽孢杆菌的芽孢菌悬液的氯化钠稀释液在 2~8 ℃ 可保存 3 个月左右,这不仅减轻了工作量,也提高了工作效率,节约了成本^[12-15]。

4.3 薄膜过滤法中供试液的浓度选择问题

4.3.1 计数试验 2015 版药典规定所加菌液的体积应不超过供试液体积的 1%,这主要是为了减小误差,降低菌液体积对供试液的稀释作用,从而提高检测结果的准确度。而我们一般使用的吸管的最小刻度为 0.1 mL,也就是说菌液的最小加入量为 0.1 mL,按 1% 的比例进行换算,那么供试液的最少加入量应为 10 mL。因此,选择低稀释级的供试液进行薄膜过滤显然行不通(正式试验之前进行了预试验),考虑到倍芪腹泻贴的抑菌性又太强,综合上述因素我们最终选择 1:100 的供试液进行薄膜过滤。

4.3.2 控制菌检查试验 倍芪腹泻贴 1:10 的供试液由于黏稠度很大,直接取 10 mL 进行控制菌检查中的薄膜过滤,很难过滤下去,影响试验的顺利进行。按照过去的方法,应该采用离心沉淀法去消除这个影响,但中国药典 2015 版微生物限度检查已不允许使用离心沉淀法制备供试液。因此,我们对供试液首先进行了 1:20 的稀释,降低了供试液的黏稠度,然后进行过滤,效果很好。另外,控制菌检查中供试液的加入量是取相当于 1 g 供试品的供试液量,所以 1:20 供试液的过滤量应该是 20 mL,而不是 10 mL^[16-17]。