

doi: 10.3969/j.issn.1009-6469.2019.12.049

◇ 医院药学 ◇

胃炎灵颗粒剂微生物限度检查方法验证

马海玲, 张咏梅, 沈花, 钱伟

作者单位: 南京中医药大学附属张家港医院药学部, 江苏 张家港 215600

通信作者: 钱伟, 男, 副主任药师, 研究方向为中药鉴定、炮制及医院自制制剂生产管理, E-mail: qwei76@163.com

基金项目: 苏州市科技计划发展项目(SYSD2016161)

摘要:目的 建立胃炎灵颗粒剂的微生物限度检查方法, 并对该检查方法进行验证。方法 参照 2015 版《中华人民共和国药典》四部通则, 采用薄膜过滤法、培养基稀释法、常规法对胃炎灵颗粒剂分别进行微生物计数检查方法的验证。采用常规法对胃炎灵颗粒剂进行控制菌检查方法的验证。结果 培养基稀释法、常规法不能消除胃炎灵颗粒剂对枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌的抑制作用, 测得回收率低于 0.50。薄膜过滤法可消除对枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌的抑制作用, 测得回收率在 0.50~2.00 范围内。控制菌检查结果显示, 培养基用量为 100 mL 时, 试验组、阳性对照组检出大肠埃希菌; 供试品对照组、阴性对照组无菌落生长。结论 胃炎灵颗粒剂的需氧菌总数检查采用薄膜过滤法, 霉菌及酵母菌总数检查和控制菌检查采用常规法。**关键词:** 中草药; 集落计数, 微生物; 微生物限度; 薄膜过滤法; 胃炎灵颗粒剂

Validation of microbial limit test method for Weiyangling granules

MA Hailing, ZHANG Yongmei, SHEN Hua, QIAN Wei

Author Affiliation: Department of Pharmacy, Zhangjiagang Hospital Affiliated to Nanjing University of TCM, Zhangjiagang, Jiangsu 215600, China

Abstract: Objective To establish a microbial limit test method for Weiyangling granules and to test its validation. **Methods** According to the four general principles of the Chinese Pharmacopoeia (edition 2015), membrane filtration method, culture medium dilution method and routine method were used to verify the microbial count of Weiyangling granules. The routine method was used to verify the method of bacteria control. **Results** The inhibitory effect of Weiyangling granules on *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus* could not be eliminated by culture medium dilution method and routine method, and the recovery rate was less than 0.50. Membrane filtration method can eliminate the inhibition of *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus*, and the recovery rate was in the range of 0.50-2.00. The results of bacteria control test showed that *Escherichia coli* was detected in experimental group and positive control group when the amount of culture medium was 100 mL. There was no colony growth in the control group and negative control group. **Conclusion** The method of membrane filtration can be used for the total number of aerobic bacteria in Weiyangling granules. The routine method can be used for the bacteria control and the total number of mould and yeast.

Key words: Drugs, Chinese herbal; Colony count, microbial; Microbial limit; Membrane filtration method; Weiyangling granules

胃炎灵颗粒剂为医院制剂, 由白芍、香附、枳实、川楝子、柴胡、党参、黄芪及白术等中药组成, 功能疏肝理气、清肝泄热、解痉止痛。临床治疗胆汁反流性胃炎疗效显著。本方多药合用, 疏肝郁, 安中焦, 使脾胃升清降浊气化复常。

中药制剂在生产中的各个环节极易被微生物污染, 影响药品的质量及安全, 因此药品的微生物检验和微生物限度控制是保障药品安全性的一项重要举措^[1]。微生物计数法包含平皿法、薄膜过滤法以及最可能数法, 平皿法是微生物计数方法中最

常用且应用较广的一种试验方法。本研究于 2018 年 8—12 月参考 2015 版《中华人民共和国药典》四部通则 1105(微生物计数法)和 1106^[2](控制菌检查法)建立胃炎灵颗粒剂的微生物限度检查方法, 并对该方法进行验证, 以保证胃炎灵颗粒剂的质量, 提高检测效率。

1 仪器与材料

1.1 仪器 Milliflex Plus 全自动微生物过滤系统(密理博公司)、BHC-1300 II A2 型生物安全柜(苏净集团苏州安泰空气技术有限公司)、HH-B11-500BS-

II 电热恒温培养箱(上海跃进医疗器械有限公司)、LMQ-C51L 立式灭菌器(山东新华医疗器械股份有限公司)、Transferpette-S 移液器(德国普兰德公司)、HH-W21-600S 电热恒温水浴箱(上海跃进医疗器械厂)、MJ-150-II 霉菌培养箱(上海索谱仪器有限公司)、AUX220 电子天平(日本岛津公司)。

1.2 菌种 枯草芽孢杆菌[CMCC(B)63501-2a18]、铜绿假单胞菌[CMCC(B)10104-2a16-1]、金黄色葡萄球菌[CMCC(B)26003-5a23-1]、大肠埃希菌[CMCC(B)44102-3a28-1]、白色念珠菌[CMCC(B)98001-2a11]、黑曲霉[CMCC(B)98003-2a11], 以上菌种均购于中国食品药品检定研究院, 均为第三代。

1.3 培养基 胰酪大豆胨液体培养基(批号 20161223)、麦康凯液体培养基(批号 20161222)、沙氏葡萄糖液体培养基(批号 20160204)、胰酪大豆胨琼脂培养基(批号 20161219)、麦康凯琼脂培养基(批号 20161107)、沙氏葡萄糖琼脂培养基(批号 20161123)、PH7.0 氯化钠-蛋白胨缓冲液(批号 20161108), 上述培养基均购于青岛高科园海博生物技术有限公司, 培养基适用性试验符合 2015 版《中华人民共和国药典》规定。4-甲基伞形酮葡萄糖苷酸培养基(批号 20170721), 购于北京牛牛基因技术有限公司。

1.4 样品 胃炎灵颗粒剂(规格: 10 克/袋; 批号 170206、170814、180319), 自制。

2 方法与结果

2.1 菌液制备 (1)将枯草芽孢杆菌、铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌接种至胰酪大豆胨液体培养基中, 32 ℃培养 24 h。吸取 1 mL 枯草芽孢杆菌、铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌的胰酪大豆胨液体培养物, 加 9 mL PH7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液, 采用 10 倍系列稀释, 使菌落数不大于 100 CFU/mL。(2)将白色念珠菌接种至沙氏葡萄糖液体培养基中, 25 ℃培养 48 h。取 1 mL 白色念珠菌的沙氏葡萄糖液体培养物, 加 9 mL PH7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液, 采用 10 倍系列稀释, 使菌落数不大于 100 CFU/mL。(3)将黑曲霉接种至沙氏葡萄糖琼脂斜面培养基中, 25 ℃培养 7 d, 取斜面培养物, 用 5 mL 含 0.05% (mL/mL) 聚山梨酯 80 的 PH7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液洗脱, 制备成孢子混悬液^[3]。吸取 1 mL 混悬液, 加 9 mL 含 0.05% (mL/mL) 聚山梨酯 80 的 PH7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液, 采用 10 倍系列稀释, 使孢子数不大于 100 CFU/mL。

2.2 供试品溶液的制备 从同一批次的两个不同

包装中共称取胃炎灵颗粒剂 10 g, 加入 PH7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液至 100 mL, 混匀, 作为 1:10 的供试品溶液。

2.3 需氧菌总数计数方法的验证

2.3.1 常规法

2.3.1.1 试验组 取 5 份 9.9 mL 1:10 供试液, 分别加入 2.1 项下的相应稀释级别的 5 种试验菌株菌悬液 0.1 mL, 混匀, 使最终试验组中菌落数不大于 100 CFU/mL。分别吸取 1 mL 上述含菌供试液于平皿中, 平行操作制备 2 块平皿, 加入胰酪大豆胨琼脂培养基, 混匀, 32 ℃倒置培养, 培养结束后计数。

2.3.1.2 菌液对照组 取 5 份 9.9 mL PH7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液, 分别加入 2.1 项下的相应稀释级别的 5 种试验菌株菌悬液 0.1 mL, 混匀, 使最终菌液对照组中菌落数不大于 100 CFU/mL。其余操作同 2.3.1.1 试验组。

2.3.1.3 供试品对照组 取 9.9 mL 1:10 供试液, 加入 PH7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液 0.1 mL, 不加菌悬液, 混匀。其余操作同 2.3.1.1 试验组。

2.3.1.4 回收率测定结果 试验组平均菌落数与供试品对照组平均菌落数的差值与菌液对照组平均菌落数的比值即为各试验菌株的回收率^[4-6]。结果见表 1。

表 1 常规法测定不同批号胃炎灵颗粒剂需氧菌总数回收率结果

菌株名称	批号			平均值
	170206	170814	180319	
枯草芽孢杆菌	0.22	0.28	0.19	0.23
铜绿假单胞菌	0.89	0.99	0.93	0.94
金黄色葡萄球菌	0.15	0.12	0.21	0.16
白色念珠菌	1.02	0.99	0.97	0.99
黑曲霉	0.92	0.92	0.98	0.94

由结果可知, 铜绿假单胞菌、白色念珠菌、黑曲霉的回收率均在 0.50~2.00 范围内。枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌的回收率分别为 0.23、0.16, 均低于 0.50, 常规法不适宜用于需氧菌总数的测定, 需更换检测方法。

2.3.2 培养基稀释法

2.3.2.1 试验组 取 2 份 9.9 mL 1:10 供试液, 分别加入相应稀释级别的枯草芽孢杆菌和金黄色葡萄球菌菌悬液 0.1 mL, 混匀, 使最终试验组中菌落数不大于 100 CFU/mL。吸取 0.2 mL 含菌供试液于平皿中, 平行操作制备 5 块平皿, 加入胰酪大豆胨琼脂培养基, 混匀, 32 ℃倒置培养, 培养 3 d 结束后测定 5 块平皿菌落数之和。

2.3.2.2 菌液对照组 取2份9.9 mL PH7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液,分别加入相应稀释级别的枯草芽孢杆菌和金黄色葡萄球菌菌悬液0.1 mL,混匀,使最终菌液对照组中菌落数不大于100 CFU/mL。其余操作同2.3.2.1 试验组。

2.3.2.3 供试品对照组 取9.9 mL 1:10 供试液,加入PH7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液0.1 mL,混匀,不加菌悬液。其余操作同2.3.2.1 试验组。

2.3.2.4 回收率测定结果 结果见表2。

表2 培养基稀释法测定不同批号胃炎灵颗粒剂枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌回收率结果

菌株名称	批号			平均值
	170206	170814	180319	
枯草芽孢杆菌	0.33	0.28	0.35	0.32
金黄色葡萄球菌	0.13	0.19	0.18	0.17

由结果可知,枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌的回收率分别为0.32、0.17,均低于0.50,培养基稀释法不适宜用于上述2种试验菌的检测,需更换检测方法。

2.3.3 薄膜过滤法

2.3.3.1 试验组 取10 mL 1:10 供试液,用100 mL PH7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液冲洗,冲洗3次,在最后1次冲洗液中分别加入相应稀释级的枯草芽孢杆菌和金黄色葡萄球菌菌悬液0.1 mL,过滤,取出滤膜,使菌面朝上放置于预制的胰酪大豆胨琼脂培养基平板上,置于32 ℃培养箱中倒置培养3 d后计数。

2.3.3.2 菌液对照组 分别取枯草芽孢杆菌和金黄色葡萄球菌菌悬液0.1 mL,用100 mL PH7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液冲洗菌悬液,过滤,取出滤膜。其余操作同2.3.3.1 试验组。

2.3.3.3 供试品对照组 取10 mL 1:10 供试液,用100 mL PH7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液冲洗,不加菌悬液,冲洗3次,过滤,取出滤膜。其余操作同2.3.3.1 试验组。

2.3.3.4 回收率测定结果 结果见表3。

表3 薄膜过滤法测定不同批号胃炎灵颗粒剂枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌回收率结果

菌株名称	批号			平均值
	170206	170814	180319	
枯草芽孢杆菌	0.84	0.90	0.86	0.87
金黄色葡萄球菌	0.96	0.98	0.97	0.97

由结果可知,枯草芽孢杆菌和金黄色葡萄球菌的回收率在0.50~2.00 范围内,说明薄膜过滤法可用

于胃炎灵颗粒剂需氧菌总数的计数。

2.4 霉菌和酵母菌总数计数方法的验证

2.4.1 试验组 取2份9.9 mL 1:10 供试液,分别加入相应稀释级别的白色念珠菌菌悬液、黑曲霉孢子悬液0.1 mL,混匀,使最终试验组中菌落数不大于100 CFU/mL。分别吸取1 mL 上述含菌供试液于平皿中,平行操作制备2块平皿,加入沙氏葡萄糖琼脂培养基,混匀,25 ℃倒置培养5 d后计数。

2.4.2 菌液对照组 取2份9.9 mL PH7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液,分别加入相应稀释级别的白色念珠菌菌悬液、黑曲霉孢子悬液0.1 mL,混匀,使最终菌液对照组中菌落数不大于100 CFU/mL。其余操作同2.4.1 试验组。

2.4.3 供试品对照组 取9.9 mL 1:10 供试液,加入PH7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液0.1 mL,不加菌悬液,混匀。其余操作同2.4.1 试验组。

2.4.4 霉菌和酵母菌总数回收率测定结果 结果见表4。

表4 常规法测定不同批号胃炎灵颗粒剂霉菌和酵母菌总数回收率结果

菌株名称	批号			平均值
	170206	170814	180319	
白色念珠菌	0.87	0.95	0.99	0.94
黑曲霉	0.99	0.87	0.96	0.94

由结果可知,白色念珠菌、黑曲霉的回收率均在0.50~2.00 范围内,说明常规法可用于胃炎灵颗粒剂霉菌和酵母菌总数的计数。

2.5 控制菌检查方法的验证

2.5.1 菌液制备 将大肠埃希菌接种至胰酪大豆胨液体培养基中,置于32 ℃培养箱中培养24 h,吸取1 mL 大肠埃希菌的胰酪大豆胨液体培养物,加9 mL PH7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液,采用10 倍系列稀释,使菌落数不大于100 CFU/mL。

2.5.2 供试品溶液的制备 同2.2 项。

2.5.3 大肠埃希菌检查方法适用性试验

2.5.3.1 试验组 取9.9 mL 1:10 供试液,加入0.1 mL 大肠埃希菌菌悬液,两者混匀后接种至100 mL 胰酪大豆胨液体培养基中,32 ℃培养24 h。取上述培养物1 mL 接种至100 mL 麦康凯液体培养基中,42 ℃培养48 h。取麦康凯液体培养物,在麦康凯琼脂培养基上划线接种,32 ℃倒置培养72 h^[7]。观察结果。

2.5.3.2 供试品对照组 取10 mL 1:10 供试液接种至100 mL 胰酪大豆胨液体培养基中,其余操作同

2.5.3.1 试验组。

2.5.3.3 阳性对照组 取大肠埃希菌菌悬液 0.1 mL,接种至 100 mL 胰酪大豆胨液体培养基中,其余操作同 2.5.3.1 试验组。

2.5.3.4 阴性对照组 取 10 mL PH7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液接种至 100 mL 胰酪大豆胨液体培养基中^[8],其余操作同 2.5.3.1 试验组。

2.5.4 结果判断 见表 5。

表 5 控制菌检查结果

组别	麦康凯琼脂分离培养	鉴定试验	
		MUG	靛基质试验
试验组	有菌落生长	阳性	阳性
阳性对照组	有菌落生长	阳性	阳性
供试品对照组	无菌落生长		
阴性对照组	无菌落生长		

注:MUG 为 4-甲基伞形酮葡萄糖苷酸培养基

由结果可知,试验组、阳性对照组有菌落生长,鉴定试验呈阳性,可判定检出大肠埃希菌;供试品对照组、阴性对照组无菌落生长。说明胃炎灵颗粒剂的控制菌检查可采用常规法。

3 讨论

胃炎灵颗粒剂为中药复方制剂,通过多味药的协同作用发挥药效,成分复杂,其中某一成分的抑菌作用都有可能影响微生物限度检查方法的准确性^[9]。采用常规法和培养基稀释法测定 5 种试验菌的回收率时,金黄色葡萄球菌和枯草芽孢杆菌的回收率均低于 0.50。大量研究表明白芍、黄连、栀子、蒲公英、土茯苓均对金黄色葡萄球菌有抑制作用^[10-15]。黄芪、党参、甘草均对金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌有抑制作用^[16-17]。处方中的大量抑菌成分抑制了供试液中菌落的生长,以致测得回收率低于 0.50。

采用薄膜过滤法时,枯草芽孢杆菌和金黄色葡萄球菌的回收率分别为 0.87、0.97,处于 0.50~2.00 范围内,符合标准要求,说明处方中的大量抑菌成分已随冲洗液冲洗滤去除。在微生物检查过程中确保被检样品的抑菌活性被消除,才能真实的反应检验结果。因此本试验最终选择薄膜过滤法进行胃炎灵颗粒剂的需氧菌总数测定是可行的。

黑曲霉在胰酪大豆胨琼脂培养基和沙氏葡萄糖琼脂培养基上培养时,菌落蔓延迅速至黑色厚绒状,难以计数。为避免黑曲霉菌落计数误差,在琼脂培养基培养 1 d 后开始逐日计数,而非培养结束

后才开始计数。

本研究经过试验验证,建立了胃炎灵颗粒剂的微生物限度检查方法,结合胃炎灵颗粒剂的生产工艺,参考 2015 版《中华人民共和国药典》四部通则 1107,进行胃炎灵颗粒剂的微生物限度检查时,采用薄膜过滤法测定胃炎灵颗粒剂的需氧菌总数,要求每 1 克胃炎灵颗粒剂中需氧菌总数不得超过 1 000 CFU;采用常规法测定霉菌和酵母菌总数,要求每 1 克胃炎灵颗粒剂中霉菌和酵母菌总数不得超过 100 CFU;采用常规法检查控制菌,要求每 1 克胃炎灵颗粒剂中不得检出大肠埃希菌。

参考文献

- [1] 胡昌勤.药品微生物控制现状与展望[J].中国药学杂志,2015,50(20):1747-1751.
- [2] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:2015年版.四部[M].北京:中国医药科技出版社,2015:140-149.
- [3] 郭红玲,邓曼静.2种外用医院制剂微生物限度检查方法学的验证与建立[J].湖南中医杂志,2017,33(12):144-146.
- [4] 施敏,管敏,周琴妹.三种具有抑菌成分的外用制剂的微生物限度检查方法验证[J].安徽医药,2015,19(12):2314-2316.
- [5] 何倩灵,郭峰,谭琴,等.芪贞慢咽宁颗粒微生物限度检查法的建立及方法学验证[J].海峡药学,2017,29(6):49-51.
- [6] 谭征,张建民,关晶,等.哮喘平颗粒《中国药典》2015年版微生物限度检查法的建立[J].北京医学,2016,38(08):837-840.
- [7] 姬俊,刘婷婷,朱世真,等.精制冠心病片微生物限度检查法的建立[J].中国药师,2016,19(9):1773-1776.
- [8] 吴宏扬,袁巍.建立5种医院制剂微生物限度检查法[J].中国卫生标准管理,2018,9(24):70-73.
- [9] 杨育儒,沈秋莲,王庆芬.六种中药制剂微生物限度检查方法验证[J].西部中医药,2017,30(11):59-61.
- [10] 彭丹,马琼丽,陈泽慧,等.40种中药提取物对6种临床常见感染菌株的体外抑菌活性观察[J].山东医药,2017,57(27):27-30.
- [11] 王华富,商振球,桂志红,等.中药黄连对临床常见耐药菌株的体外抑菌活性分析[J].中国药师,2018,21(09):1662-1664.
- [12] 杨宏博,苏敏,刘慧浪,等.基于生物热力学的黄连不同提取部分抑菌活性分析[J].中国实验方剂学杂志,2017,23(16):51-56.
- [13] 陈娜,王冬雪,王雪娟,等.蒲公英中绿原酸提取及抑菌活性研究[J].海峡药学,2016,28(12):16-19.
- [14] 邱志宏,张彩虹.蒲公英水提物对临床耐药菌体外抑菌作用的研究[J].临床合理用药杂志,2018,11(35):125-126.
- [15] 岳子强,陈琼科,吴清.金银花及蒲公英体外抑菌作用观察[J].实用中医药杂志,2018,34(02):264-265.
- [16] 段琦梅,梁宗锁,杨东风,等.黄芪、党参乙醇提取物抗菌活性研究[J].中成药,2012,34(11):2220-2222.
- [17] 杨静,常小强,王霞,等.甘草活性成分提取及抑菌活性研究[J].河南科学,2017,35(10):1587-1591.

(收稿日期:2019-02-02,修回日期:2019-04-02)