引用本文:夏天,崔迎,任文鑫,等.清火片(胶囊)微生物限度检查方法适用性试验[J].安徽医药,2021,25(6):1114-1117.**DOI:10.3969/j.issn.1009-6469.2021.06.012.**

◇药物分析◇

清火片(胶囊)微生物限度检查方法适用性试验

夏天,崔迎,任文鑫,王愚,杨晓东

作者单位:西安市食品药品检验所微生物室,陕西 西安 710000

通信作者:杨晓东,男,主任药师,研究方向为食品药品微生物检验,Email:yx6600@163.com

摘要: **目的** 对国内22家企业生产的清火片(胶囊)的微生物限度方法学进行研究比对,确定适合每家企业的微生物限度检查方法。**方法** 按照《中国药典》2015版四部微生物限度检查法(通则1105、通则1106)对清火片(胶囊),进行方法适用性试验。**结果** 266批清火片(胶囊)微生物限度检查结果全部符合规定,其中207批需氧菌总数结果<10 CFU/g,263批样品霉菌和酵母菌总数结果<10 CFU/g。清火片(胶囊)需氧菌总数计数采用薄膜过滤法,各个厂家的样品冲洗程度略有不同,霉菌和酵母菌总数计数采用平皿法,控制菌检查采用常规法。**结论** 本实验室确认的清火片(胶囊)的微生物限度检查方法与企业提供的方法有差异,然而,现有的微生物限度检查结果全部符合《中国药典》的标准规定。

关键词: 细菌载量; 集落计数,微生物; 清火片(胶囊); 微生物限度; 检查方法; 金黄色葡萄球菌

Research on applicability test of microbial limit test for *Qinghuo* tablets (capsules)

XIA Tian,CUI Ying,REN Wenxin,WANG Yu,YANG Xiaodong

Author Affiliation:Microbiology Room of Xi'an Institute for Food and Drug Control, Xi'an, Shaanxi 710000*, China*

Abstract: **Objective** To confirm suitable microbial limit test method of every manufacturer by researching, and to determine the microbial limit test method of *Qinghuo* tablets (capsules) produced by 22 domestic manufacturers.**Methods** *Qinghuo* tablets (capsules) were tested for the applicability of the method according to the microbial limit test method in *Pharmacopoeia of the People's Republic of China* (ChP) 2015 edition volume Ⅳ (general principles 1105 and 1106).**Results** The microbial limit test results of 266 batches of *Qinghuo* tablets (capsules) were all in line with the requirements, including 207 batches of aerobic bacteria less than 10 CFU/g, 263 batches of samples of moulds and yeasts less than 10 CFU/g. Membrane filtration method can be used to determine the total number of aerobic bacteria in *Qinghuo* tablets (capsules). The degree of sample flushing varied slightly in different manufacturers. The plate method can be used to determine the total number of moulds and yeasts, and the routine method can be used to examine control bacteria.**Conclusions** There are some differences between the microbial limit test method of *Qinghuo* tablets (capsules) confirmed by our laboratory and the method provided by manufacturers. However, the existing microbial limit inspection results all conform to the standard provisions in ChP.

Key words: Bacterial load; Colony count, microbial; *Qinghuo* tablets (capsules); Microbial limit; Test method; Staphylococcus aureus

清火片(胶囊)是由大青叶、大黄、石膏和薄荷脑四味药材制成的中药成方制剂,主要针对咽喉肿痛、牙痛、头晕目眩、口鼻生疮、风火目赤、便秘等症状[1],其中大青叶和大黄是主要成分。有研究表明大青叶的主要抑菌成分是黄酮类化合物[2],该类物质具有直接抗菌活性[3],对金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌与福氏志贺菌等多种微生物都有抑制作用,尤其针对金黄色葡萄球菌,抑制性明显强于其他细菌[4];大黄的主要抑菌成分是蒽醌类化合物[5],对金黄色葡萄球菌具有很强的抑制性[6-7]。建立适宜的微生物限度检查方法,需要消除药品对微生物的抑制性,而检查方法确立的正确与否,也直接影响检查结果的准确性。

为了保证清火片(胶囊)微生物限度检查结果的客观性和准确性,我们对清火片(胶囊)的微生物限度检查方法进行了确认,本单位于2018年1—8月按照《中国药典》2015版四部(以下简称《药典》)通则1105非无菌产品微生物限度检查:微生物计数法和通则1106非无菌产品微生物限度检查:控制菌检查法的要求[8],对22家企业生产的清火片(胶囊)进行方法适用性研究。

1 材料与方法

1.1 材料 清火片(胶囊)作为2018年国家药品评价性抽检项目之一,本单位共收到22家企业生产的

266批次的样品,其中清火片的生产企业为21家,清火胶囊的生产企业仅有1家。这22家企业均对各自生产的清火片(胶囊)做了微生物限度检查方法适用性研究,并制订了相应的检查方法。本实验室收集方法材料,并整理归纳,以便对比分析。

1.2 样品 样品全部来自本次国抽项目,共计22家生产企业,每家企业选择一批清火片(胶囊)为供试品,进行方法适用性试验。

1.3 条件要求 所有检查环境设施均符合《药典》的要求[8]。试验中凡是与供试品接触的器皿在使用前均经过0.1 Mpa 121 ℃湿热灭菌30 min。试验所用培养基、稀释液均按照《药典》的要求配制,所用菌种均来自中国食品药品检定研究院。

1.4 主要仪器设备 LRH-250型需氧菌培养箱、MJ-Ⅱ型霉菌和酵母菌培养箱、LRH-250型控制菌培养箱均购于上海一恒科技有限公司,SX-500型压力蒸汽灭菌器购于TOMY(日本托米)公司,LFHC31型集菌仪购于默克密理博公司。

1.5 菌种及菌液制备 菌种:金黄色葡萄球菌[CMCC(B)26003]、大肠埃希菌[CMCC(B)44102]、铜绿假单胞菌[CMCC(B)10104]、枯草芽孢杆菌[CMCC(B)63501]、白色念珠菌[CMCC(F)98001]、黑曲霉[CMCC(F)98003]、沙门氏菌[CMCC(B)50094]。

菌液制备:取金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、枯草芽孢杆菌、大肠埃希菌、沙门氏菌、白色念珠菌新鲜培养物,分别用pH 7.0无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液10倍递增稀释,制成含菌数小于10 000 CFU/mL的菌悬液,备用。

取黑曲霉新鲜培养物,用3~5 mL含0.05%(mL/mL)聚山梨酯80的pH 7.0无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液,将孢子洗脱。然后采用适宜的方法吸出孢子悬液至无菌试管内,用含0.05%(mL/mL)聚山梨酯80的pH 7.0无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液制成含孢子数小于10 000 CFU/mL的孢子悬液,备用。

1.6 微生物限度标准 根据清火片(胶囊)的质量标准和《药典》四部1107非无菌药品微生物限度标准,确定清火片(胶囊)的微生物限度标准是:需氧菌总数不得超过10^4 CFU/g;霉菌和酵母菌总数不得超过10^2 CFU/g;不得检出大肠埃希菌(1 g);不得检出沙门菌(10 g);耐胆盐革兰阴性菌应小于10^2 CFU(1 g)。

1.7 计数方法适用性试验 标准规定:每次的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应在0.5~2.0范围内。

供试液的制备:称取供试品10 g,加pH 7.0的无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液(耐胆盐革兰阴性菌检查用胰酪大豆胨液体培养基作为稀释剂)至100 mL,混匀,制成1∶10的供试液。

1.7.1 *需氧菌总数计数方法适用性试验*

1.7.1.1 *平皿法* 清火片(胶囊)的需氧菌总数计数方法适用性试验,首先采用平皿法,分别取1∶10供试液、1∶50供试液、1∶100供试液,1毫升/皿,对试验组、菌液组和供试品对照组的菌数进行测定,按照《药典》四部通则1105中的规定进行试验,并计算供试品中微生物的回收率。

1.7.1.2 *薄膜过滤法* 在使用平皿法供试品试验组的回收率达不到规定值时,则考虑采用薄膜过滤法进行进一步试验[9]。取1∶10供试液,1毫升/膜,每张滤膜每次冲洗量为100 mL,分别冲洗1次、2次,用pH 7.0的无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液作为冲洗液,测定试验组、菌液组和供试品对照组的菌数,按照《药典》四部通则1105中的规定进行试验,并计算供试品中微生物的回收率。

1.7.2 *霉菌和酵母菌总数计数方法适用性试验* 采用平皿法试验,取1∶10供试液,1毫升/皿,分别对试验组、菌液组和供试品对照组进行测定,按照《药典》四部通则1105中的规定进行试验,并计算供试品试验组的回收率。

1.7.3 *控制菌方法适用性试验* 控制菌包括耐胆盐革兰阴性菌、大肠埃希菌和沙门菌,均采用常规法进行方法适用性试验。耐胆盐革兰阴性菌采用常规法,将1∶10供试液置20~25 ℃培养2 h,取相当于0.1 g,0.01 g,0.001 g供试品的预培养物,分别接种至10 mL肠道菌增菌液体培养基中,按照《药典》四部1106规定项下方法检查;大肠埃希菌采用常规法,取1∶10供试液10 mL,接种至100 mL胰酪大豆胨液体培养基中,按照《药典》四部1106规定项下方法检查;沙门菌采用常规法,取供试品10 g,接种至100 mL胰酪大豆胨液体培养基中,按照《药典》四部1106规定项下方法检查,分别对阳性对照组、阴性对照组、试验组和供试品对照组进行试验。

2 结果

2.1 样品微生物限度检查结果 本实验室检查结果全部符合《药典》的标准规定。需氧菌总数有207批样品的结果<10 CFU/g,32批次样品结果在10~100 CFU/g,19批次样品的结果在>100~1 000 CFU/g,而仅有8批样品需氧菌总数的结果>1 000 CFU/g。霉菌和酵母菌总数计数有263批样品结果为<10 CFU/g,仅3批样品有霉菌和酵母菌生长,结果均在20~30 CFU/g范围内,控制菌检查结果均符合规定。这为我们进行方法适用性试验奠定了良好的基础。

2.2 需氧菌总数检查方法 试验结果显示,供试品采用平皿法计数,金黄色葡萄球菌试验组的回收比值不在标准规定的0.5~2.0范围内,而铜绿假单胞菌、枯草芽孢杆菌、白色念珠菌和黑曲霉试验组的回收比值均在该范围内,表明清火片(胶囊)对金黄色葡萄球菌的抑制性最为显著。而从薄膜过滤法的试验结果看出,金黄色葡萄球菌试验组的回收比值可以达到0.5~2.0之间。故清火片(胶囊)的需氧菌总数应采用薄膜过滤法(1∶10供试液,1毫升/皿,不同厂家冲洗量略有不同)计数,详见表1。

2.3 霉菌和酵母菌总数检查方法 试验结果表明所有供试品的白色念珠菌和黑曲霉的比值均在0.5~2.0范围内,因此可以采用平皿法(1∶10供试液,1毫升/皿)对清火片(胶囊)进行霉菌和酵母菌总数计数。

2.4 控制菌检查方法 所有供试品的阳性对照试验均检出阳性菌,阴性对照试验均未生长,试验组均检出阳性菌。因此,可以采用常规法对清火片(胶囊)进行控制菌检查。

2.5 小结 2018年国家评价性抽验项目——清火片(胶囊)(共计22个厂家)的微生物限度检查方法为:需氧菌总数计数采用薄膜过滤法(1∶10供试液,取1毫升/皿过滤,不同厂家的冲洗量略有不同),霉菌和酵母菌总数计数采用平皿法(1∶10供试液,取1毫升/皿),耐胆盐革兰阴性菌采用常规法(1∶10供试液20~25 ℃培养2 h,取相当于0.1 g,0.01 g,0.001 g供试品的预培养物分别接种至10 mL肠道菌增菌液体培养基中,按照《药典》四部1106规定项下方法检查),大肠埃希菌采用常规法(取1∶10供试液10 mL,接种至100 mL胰酪大豆胨液体培养基中,按照《药典》四部1106规定项下方法检查),沙门菌采用常规法(取供试品10 g,接种至100 mL胰酪大豆胨液体培养基中,按照《药典》四部1106规定项下方法检查)。

3 讨论

根据各企业提供的微生物限度检查方法,266批次清火片(胶囊)的微生物限度检查结果全部符合规定。其中78%样品的需氧菌总数结果为0,97%样品的需氧菌总数在1 000 CFU/g以内,有8批次样品超过1 000 CFU/g,最高值为3 000 CFU/g。检查结果表明少数批次的清火片(胶囊)存在不同程度的微生物污染情况,影响因素可能包括:样品的

表1 清火片需氧菌总数计数方法适用性试验结果比较

样品名称	生产企业	企业提供方法	验证结果
清火胶囊	江西药都仁和制药有限公司	平皿法(1∶100供试液,1毫升/皿)	薄膜过滤法(1∶10供试液,1 mL过滤,冲洗100毫升/膜)
清火片	吉林省康福药业有限公司,	平皿法(1∶10供试液,1毫升/皿)	
	广西天天乐药业股份有限公司,		
	中山市恒生药业有限公司,		
	广西圣民制药有限公司,		
	广西百琪药业有限公司,		
	江西省芙蓉堂药业股份有限公司,		
	江西山香药业有限公司,		
	广西方略集团龙州制药有限公司,		
	健民集团叶开泰国药(随州)有限公司,		
	湖南富兴飞鸽药业有限公司,		
	河北奥星集团药业有限公司		
	陕西兴邦药业有限公司	平皿法(1∶20供试液,1毫升/皿)	
	承德燕峰药业有限责任公司	平皿法(1∶10供试液,0.2毫升/皿)	
	伊春金北药制药有限公司,	平皿法(1∶50供试液,1毫升/皿)	
	天津同仁堂集团股份有限公司		
	江西华太药业有限公司,	平皿法(1∶100供试液,1毫升/皿)	
	广西正堂药业有限责任公司,		
	云南龙发制药有限公司		
	广西清川仁源药业有限公司	薄膜过滤法(1∶10供试液,1 mL过滤,冲洗200毫升/膜)	
	广西维威制药有限公司	平皿法(薄膜衣片1∶100供试液,1毫升/皿;糖衣片1∶50供试液,1毫升/皿)	薄膜过滤法(薄膜衣片:1∶10供试液,1 mL过滤,冲洗200毫升/膜;糖衣片:1∶10供试液,1 mL过滤,冲洗100毫升/膜)
	华佗国药股份有限公司	平皿法(1∶10供试液,1毫升/皿)	薄膜过滤法(1∶10供试液,1 mL过滤,冲洗200毫升/膜)

原辅料来源和质量不同;样品在生产过程和储存环境中的温湿度存在差异;药材提取工艺中具体参数不尽相同;人员操作规范程度等等,这些情况都会影响样品微生物载荷[10]。另外,清火片(胶囊)含有药材原粉,也会增加样品携带微生物的概率。266批次样品微生物限度检查结果全部符合规定,从侧面反映出随着新版《药品生产质量管理规范》的颁布与实施,国内药品生产企业在人、机、料、法、环、测等方面的管理越来越规范[11-12],卫生水平得到提高,保障了药品使用的安全性,这一点值得肯定。

本次试验的结果显示,清火片(胶囊)微生物限度检查方法差异最大的项目是需氧菌总数计数,仅1家企业生产的清火片与企业提供的试验方法相同,其余21家企业提供的计数法为平皿法,而本单位验证结果为薄膜过滤法。分析这种差异的原因,可能有以下几个方面:各实验室菌种来源、保藏和传代情况不同,导致菌种活力上的差异;供试液制备时的温度、加热方式与保温时间不同,导致供试液药物有效成分含量的差异;另外操作人员、仪器耗材与环境的不同也可能引起不同的试验结果[13]。21家企业生产的清火片的微生物限度检查法在本实验室未得到重现,这种情况值得关注。

整理本单位收集到的所有清火片(胶囊)微生物限度检查方法材料,发现一些不规范的情况。第一,白色念珠菌与黑曲霉既要作为需氧菌总数用TSA进行计数方法性试验,也要作为霉菌和酵母菌总数用SDA进行计数方法适用性试验,二者缺一不可[14-15]。第二,控制菌的方法适用性试验必须做阳性对照试验[15-16],有的企业只做了试验组和阴性对照组,并未做阳性对照试验。

各厂家产品需氧菌总数计数采用的薄膜过滤法[17],冲洗量略有不同,这可能是由于各个厂家的原料来源不同,成品中有效成分含量存在差异,导致抑菌活性有所不同。

清火片的成分是大青叶、大黄、石膏、薄荷脑,辅料为淀粉,其中大青叶和大黄两味药材是主要成分,有研究表明大青叶对细菌的抑制性相对较强[2],尤其是对金黄色葡萄球菌的抑制效果更为明显,大黄对金黄色葡萄球菌也有很强的抑制性[18-19]。本次清火片微生物限度检查验证试验中,发现采用平皿法对清火片需氧菌总数进行计数方法适用性试验时,金黄色葡萄球菌的试验组回收比值不能达到规定范围,而在改用薄膜过滤法后,金黄色葡萄球菌的试验组回收率均达到规定值。不难看出,清火片(胶囊)对金黄色葡萄球菌的抑制作用最为显著,恰恰印证了上述研究结论。

参考文献

[1] 张楠,杨媛媛,谢志民. 清火片质量评价研究[J]. 现代中药研究与实践,2018,32(2):54-57.

[2] 刘富康,方士元,曲映红. 大青叶粗黄铜提取及其抑菌性研究[J]. 山东化工,2018,47(21):34-35,38.

[3] 刘旺景,敖长金,萨茹丽,等. 植物提取物抑菌活性及作用机理[J]. 动物营养学报,2016,28(8):2344-2452.

[4] 靳蕊,徐敏纹,刘莹,等. 黄酮类化合物的抑菌作用及其机制的研究[J]. 继续医学教育,2016,30(8):152-154.

[5] 虞夏晖,张旭冉,朱雨晴,等. 大黄蒽醌化合物的提取工艺及其体外抑菌活性[J]. 中华中医药杂志,2018,33(11),5186-5189.

[6] 易伟,李思,吴晶晶,等. 4种大黄制剂微生物限度检查方法验证及分析[J]. 中国药业,2018,27(22):33-37.

[7] 孟婷婷, 陈星, 慕甜甜, 等. 大黄对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌抗感染能力的研究[J].临床医药文献电子杂志,2017,4(9):1601,1603. DOI: 10.3877/j.issn.2095-8242.2017.09.011.

[8] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:2015年版 一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:140-150.

[9] 卫延明,闵朕,陈子龙,等. 倍芪腹泻贴微生物限度检查方法的适用性试验[J]. 安徽医药,2018,22(10):1877-1880.

[10] 李辉,杨静,贾萌,等. 2014~2018年药品生产飞行检查中的常见微生物问题分析与对策探讨[J]. 中国药师,2019,22(2):310-314.

[11] 刘业飞,郑正,陈扣宝. 药品生产企业检验能力评估分析方法初探[J]. 安徽医药,2015,19(6):1209-1211.

[12] 冯震,钟玮,刘冬玲,等. 复方益肝灵制剂中检出微生物的分型溯源与产品质量评价[J]. 药物分析杂志,2015,35(12):2083-2088.

[13] 张小莉. 药品微生物限度检查误差的影响因素及控制方法[J]. 中国药业,2018,27(6):90-92.

[14] 胡婧,邓莉,胡斌,等. 四味颗粒微生物限度检查方法学验证[J]. 中国药业,2019,28(7):26-29.

[15] 张小莉. 药品微生物限度检查方法适用性资料问题分析[J]. 中国药业,2019,28(8):79-81.

[16] 蔡长虹,魏立平. 舒肝和胃丸微生物限度检查方法的适用性[J]. 医药导报,2017,36(9):1038-1040.

[17] 董勇. 薄膜过滤法在药品检验中的应用研究[J]. 临床合理用药杂志,2018,11(6A):105-106,108.

[18] 谢娜,李超,冯俊涛,等. 11种植物提取物对4种病原细菌的抑菌活性筛选[J]. 热带作物学报,2018,39(6):1166-1171.

[19] 曾金香. 清火片中大黄灭菌工艺研究[J]. 海峡药学,2017,29(12):41-44.

(收稿日期:2019-04-18,修回日期:2019-05-15)