中国药业
China Pharmaceuticals
2021年4月20日 第30卷第8期
Vol. 30, No. 8, April 20, 2021

doi:10.3969/j.issn.1006－4931.2021.08.015

芪连降糖片微生物限度检查方法适用性研究

沈 锐[1],周 剑[2,3△],严海元[1],沈 伟[1],赵壮志[1]

(1. 重庆市永川食品药品检验所,重庆 402160; 2. 重庆市食品药品检验检测研究院,重庆 401121;
3. 重庆市药物过程与质量控制工程技术研究中心,重庆 401121)

摘要:目的 建立芪连降糖片的微生物限度检查方法。**方法** 分别采用稀释法、平皿法、薄膜过滤法,加入金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、枯草芽孢杆菌、白色念珠菌、黑曲霉进行计数法适用性试验;将10 mL 1∶10和1∶50(*m*/*V*)供试液分别接种至胰酪大豆胨琼脂培养基、胰酪大豆胨液体培养基中,接种大肠埃希菌进行控制菌检查适用性试验。**结果** 需氧菌总数的计数采用薄膜过滤法(1∶10供试液,*m*/*V*),霉菌和酵母菌总数的计数采用平皿法(1∶10供试液,*m*/*V*),控制菌检查采用培养基用量100 mL的平皿法符合要求。**结论** 联用平皿法和薄膜过滤法的微生物计数法可有效去除芪连降糖片中微生物的抑菌作用,有利于检出潜在污染微生物。

关键词:芪连降糖片;微生物限度;抑菌;计数方法;质量控制

中图分类号:R932;R284.1 **文献标志码:**A **文章编号:**1006－4931(2021)08－0052－03

Microbial Limit Suitability Test Method for Qilian Jiangtang Tablets

SHEN Rui[1], ZHOU Jian[2,3], YAN Haiyuan[1], SHEN Wei[1], ZHAO Zhuangzhi[1]

(*1. Chongqing Yongchuan Institute for Food and Drug Control, Chongqing, China 402160; 2. Chongqing Institute for Food and Drug Control, Chongqing, China 401121; 3. Chongqing Engineering Research Center for Pharmaceutical Process and Quality Control, Chongqing, China 401121*)

Abstract: Objective To establish a microbial limit test method for Qilian Jiangtang Tablets. **Methods** Dilution method, plate method and membrane filtration method were adopted for the suitability test of counting method of *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans* and *Aspergillus niger*. Precisely 10 mL of 1∶10 and 1∶50(*m*/*V*) test solution was inoculated into agar medium and liquid medium of casein soybean peptone respectively, and *Escherichia coli* was inoculated for the suitability test of control bacteria. **Results** The membrane filtration method was used for the determination of the total number of aerobic bacteria(1∶10 of test solution, *m*/*V*), the plate method was used for the determination of the total number of mould and yeast(1∶10 of test solution, *m*/*V*), the plate method with the amount of culture medium of 100 mL was used for the control bacteria test, which met the requirements. **Conclusion** The microbial count method combined with the plate method and membrane filtration method can effectively remove the antibacterial effect of microorganisms in Qilian Jiangtang Tablets, which is conducive to the detection of potentially contaminated microorganisms.

Key words: Qilian Jiangtang Tablets; microbial limit; bacteriostasis; counting method; quality control

芪连降糖片用于治疗2型糖尿病,有生津止渴、活血化瘀功效,临床多用于消除糖尿病患者的内热,缓解其气虚。其主要成分为黄芪、黄连等中药材,黄芪中黄芪甲苷可降血糖,调血脂,抑制炎症,改善血管病变等;黄连中黄连素能促进胰岛素分泌,防止肝糖原异生[1]。黄芪甲苷对革兰阳性菌和革兰阴性菌均有抑制作用,故黄芪对金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、大肠埃希氏菌有强烈的抑制作用,但对酵母菌、黑曲霉等真菌类几乎无抑制作用[2];同抗菌肽结合后的黄芪对铜绿假单胞菌也有抑制作用[3]。黄连水提物黄连素主要是对革兰阳性球菌(如金黄色葡萄球菌)和革兰阴性短杆菌(如大肠埃希菌)抑制作用明显[4]。由于上述成分的抑菌作用,常规法检查结果不能真实反映该药物的微生物污染情况。本研究中采取稀释法、薄膜过滤法与平皿法进行渐进式研究,建立了芪连降糖片的微生物限度适用性检查方法[5]。现报道如下。

1 仪器、试药与菌株

1.1 仪器

TE2101－L型电子天平(德国Sartorius公司);SPX－150F－Ⅱ型立式生化培养箱(上海龙跃仪器设备公司);MJ－150－Ⅰ型霉菌培养箱(上海齐欣科学仪器有限公司);GI80TW型立式高压蒸汽灭菌器(厦门致微仪器有限公司);ZWF－110X50型恒温培养振荡器(上海智城分析仪器制造有限公司);MZ－301型微生物限度仪(杭州美卓生物科技有限公司);BX53F型显微镜带成像系统(日本Olympus株式会社);VITEK 2 Compact全自动细菌鉴定及药敏分析系统(法国生物梅里埃股份有限公司)。

1.2 试药

芪连降糖片(首都医科大学某附属医院,批号为20191201,规格为每片0.56 g);pH 7.0无菌氯化钠－蛋白胨缓冲液、0.1%蛋白胨缓冲液(0.1% Peptone

第一作者:沈锐,女,硕士研究生,中级工程师,研究方向为药物微生物检验,(电子信箱)732502948@qq.com。
△**通信作者:**周剑,男,大学本科,副主任药师,研究方向为药物微生物检验,(电子信箱)40257199@qq.com。

Buffer)、胰酪大豆胨琼脂(TSA)培养基、胰酪大豆胨液体(TSB)培养基、沙氏葡萄糖琼脂培养基(SDA)培养基、麦康凯液体(MacConkey Broth)培养基、麦康凯琼脂(MacConkey Agar)培养基,均购自北京三药科技开发公司;氯化钠(成都科隆化学品有限公司)。

1.3 菌株

金黄色葡萄球菌[CMCC(B)26003]、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]、大肠埃希菌[CMCC(B)44102]均由中国医学细菌保藏管理中心提供。

2 方法与结果

2.1 微生物计数方法学试验

2.1.1 培养条件与质控标准

按 2015 年版《中国药典(四部)》微生物限度检查法的要求,本试验需氧菌在 35 ℃下培养 72 h;霉菌和酵母菌在 25 ℃下培养 120 h,均逐天观察;菌落数接种量控制在 10^2 cfu/mL 以内。计算回收比值,回收比值 =(试验组菌落数 - 供试品对照组菌落数)/菌液对照组菌落数,比值须在 0.5 ~ 2.0 范围内。

2.1.2 菌液及溶液制备

菌液:将金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、铜绿假单胞菌、白色念珠菌标准工作菌株用无菌生理盐水制成含菌量≤10^4 cfu/mL 的菌悬液;将黑曲霉孢子用无菌生理盐水加入 0.05% 聚山梨酯 80 制成含菌量≤10^4 cfu/mL 的菌悬液。最终加入供试品溶液中的含菌量≤10^2 cfu/mL。

供试品溶液:称取供试品 10 g,以 pH 7.0 无菌氯化钠 - 蛋白胨缓冲液作为稀释液,稀释至 100 mL,经 45 ℃水浴摇床振荡 20 min,将其混匀,制成 1∶10 供试品溶液。取供试品溶液 20 mL,加稀释液 80 mL,制成 1∶50 供试品溶液。

2.1.3 计数方法适用性试验

平皿法:取 1∶10 供试品溶液 5 份,分别加入药典规定的 5 种试验菌混悬液,使供试品溶液中含菌量≤10^2 cfu/mL,作为试验组;另取 1 份作为供试品对照组。菌液对照组,以稀释液替代供试品溶液,分别加入 5 种试验菌液。充分溶解混匀后,各移取 1 mL 置 2 个相应的无菌平皿(90 mm)中,分别倾注 TSA,TSB,SDA 培养基。结果金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌回收比值超出 0.5 ~ 2.0 范围,说明 1∶10 供试品溶液对这两种菌有较强抑菌性;霉菌和酵母菌总数计数中,2 种试验菌回收比值均在 0.5 ~ 2.0 内,说明霉菌和酵母菌计数可采用常规平皿法。详见表 1。

稀释法:取 1∶50 供试品溶液 6 份,照平皿法操作。结果试验菌金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌回收比值略有改善,但仍超出 0.5 ~ 2.0 范围,证明稀释法可降低供试品的抑菌性,但未完全消除其抑菌性。详见表 1。

表 1 需氧菌、霉菌、酵母菌总数预试验结果(平皿法/稀释法/薄膜过滤法,n = 3)

Tab. 1 Pre - test results of the determination of the total number of aerobic bacteria, moulds and yeasts (plate method/dilution method/membrane fillration method, n = 3)

菌种	含菌量(cfu/mL)			回收比值
	试验组	供试品对照组	菌液对照组	
金黄色葡萄球菌(TSA)	3/29/59	0/0/0	80/86/70	0.04/0.34/0.84
铜绿假单胞菌(TSA)	50/72/65	0/0/0	83/89/73	0.60/0.81/0.89
枯草芽孢杆菌(TSA)	10/30/44	0/0/0	63/68/53	0.16/0.44/0.83
白色念珠菌(TSA)	39/45/42	0/0/0	58/59/9	0.67/0.76/0.86
黑曲霉(TSA)	27/31/25	0/0/0	40/41/30	0.68/0.76/0.83
白色念珠菌(SDA)	40/49	0/0	58/59	0.69/0.83
黑曲霉(SDA)	30/34	0/0	40/40	0.75/0.85

薄膜过滤法:只做需氧菌总数测定方法适用性。取 1 mL 1∶10 供试品溶液,置 50 mL pH 7.0 NaCl - 蛋白胨缓冲液中,薄膜过滤,用 0.1% 蛋白胨缓冲液 300 mL 冲洗 3 次(每次 100 mL),试验组在最后一次冲洗液中加入含菌量≤10^2 cfu 的试验菌;供试品对照组以稀释液代替菌液;菌液对照组以稀释液代替供试品溶液。将菌面朝上的滤膜贴于 TSA 培养基平板上(90 mm),每株试验菌平行制备 2 个平皿。结果各需氧菌回收比值均在 0.5 ~ 2.0 范围内,表明该方法可用于需氧菌总数测定。详见表 1。

2.1.4 验证试验

取样品,按上述方法进行 3 次独立试验,验证计数方法适用性。结果金黄色葡萄球菌(TSA)、铜绿假单胞菌(TSA)、枯草芽孢杆菌(TSA)、白色念珠菌(TSA)、黑曲霉(TSA)、白色念珠菌(SDA)、黑曲霉(SDA)的回收率比值依次为 0.84,0.89,0.83,0.86,0.83,0.69,0.75,均符合要求。故宜采用取 1 mL 1∶10 供试品溶液置 50 mL pH 7.0 NaCl - 蛋白胨缓冲液过滤,每膜冲洗量 300 mL 进行需氧菌总数计数;平皿法进行霉菌和酵母菌总数计数。

2.2 控制菌检查方法适用性试验

2.2.1 菌液及溶液制备

将标准工作菌株大肠埃希菌用无菌生理盐水制成菌悬液,加入供试品溶液中的菌落数≤10^2 cfu。同 2.1.2 项下方法制成 1∶10 供试品溶液。

2.2.2 方法适用性试验

取 2.2.1 项下 1∶10 供试品溶液 10 mL 及≤10^2 cfu 试验菌的菌悬液(大肠埃希菌),接种至 100,200 mL TSB 培养基中,混匀,作为试验组 A 和 B;供试品对照组以稀释液代替菌液;菌液对照组以稀释液代替供试品溶液。TSB 培养基 35 ℃培养 18 h,取 1 mL 接种至 100 mL 麦康凯液体培养基中,44 ℃培养 24 h;取麦康凯液体培养物划线接种于麦康凯琼脂培养基平板上,35 ℃培养 18 h。

2.2.3 适用性试验结果

采用平皿法，以100 mL TSB培养基作为增菌液，麦康凯液体培养基和麦康凯琼脂培养基平板上均呈阳性，但大肠埃希菌浓度较低；稀释法以200 mL TSB培养基作为增菌液，阳性明显，菌落生长较好。以经济高效为前提综合考虑，最终以100 mL TSB培养基作为增菌液，已能满足控制菌检查要求。结果见表2（表中麦康凯液体培养基中，+为浑浊，紫色变黄色；-为澄清，显紫色；+-为轻微浑浊，且紫色变淡黄色。麦康凯琼脂培养基平板中，+为桃红色典型菌落生长；-为无典型菌落生长；+-为呈较少桃红色、不透明菌落）。

表2 大肠埃希菌控制菌检查方法适用性试验结果（$n=3$）

Tab. 2 Results of the suitability tests for the control bacteria of *Escherichia coli*（$n=3$）

验证方法	培养基	试验组	供试品对照组	菌液对照组	阴性对照组
平皿法（100 mL）	麦康凯液体培养基	+-	-	+	-
	麦康凯琼脂培养基平板	+-	-	+	-
稀释法（200 mL）	麦康凯液体培养基	+	-	+	-
	麦康凯琼脂培养基平板	+	-	+	-

2.2.4 验证试验

取芪连降糖片，进行3次独立试验。以100 mL胰酪大豆胨液体培养基作为增菌液，结果可信、有效，表明该方法可行。

2.3 微生物限度检查

按2次验证试验方法对样品进行微生物限度检查。样品中需氧菌总数、霉菌和酵母菌总数均低于10 cfu/g，未检出控制菌大肠埃希菌，符合2015年版《中国药典（四部）》通则1107“非无菌药品微生物限度标准”相关要求。

3 讨论

2015年版《中国药典》相较2010年版，在微生物限度检查中改变了加菌方式及培养基，在更贴合国外药典的同时兼顾了中国特色[6]。在供试品制备阶段加入菌液，使菌液和供试液充分混合，更好地模拟了样品污染情况，同时样品中的成分能充分作用于病原菌，更好地反映药物对病原菌是否有抑制作用，但也增加了试验操作的难度[7]。

本品主要成分黄芪和黄连两味药材具有较强的抑菌作用，验证方法的选择中显示，常规法＞培养基稀释法＞培养基稀释-薄膜过滤联用法[8]。本研究中在选择方法时从常规法到稀释法逐步试验，测定需氧菌总数时采用1∶10供试品溶液平皿法，增加稀释液体积，均无法消除供试品的抑菌性。中成药的抑菌性无法选择合适的中和剂消除抑菌性，薄膜过滤法能直接彻底消除抑菌作用，计数结果准确度高[9]。中成药固体制剂中含有大量不溶性辅料，预试验中建立了培养基稀释-薄膜过滤联用法进行冲洗，每膜以300 mL及500 mL为冲洗液，结果试验菌均生长良好，最终确定以50 mL pH7.0无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液稀释，300 mL 0.1%蛋白胨缓冲液冲洗3次，每次100 mL。选用的方法操作简捷高效，加样回收率好[10]。在控制菌的方法学验证中，很多文献均首要考虑是否呈强阳性，而忽略了在方法学建立时应同时考虑快捷、经济，本试验中对控制菌增菌培养基体积的选择兼顾了以上原则。

在对黑曲霉进行计数时，应逐天观察，由于黑曲霉易蔓延生长，不易计数，所以白色菌丝生长出来就应计数。另外，以稀释液作为空白对照，计数与控制菌检查均应显阴性，否则试验失败需重新进行[11]。2015年版《中国药典》中非无菌微生物计数主要还是以中成药及化学药为主，未涉及中药材，2020年版《中国药典》已将中药材纳入其中，越来越多的研究涉及中药饮片的微生物计数检查[12-13]，如杨瑞琦等[14]的肉豆蔻饮片微生物计数研究及李艳等[15]的6种中药饮片微生物检测状况分析等，为后续不断深入研究奠定了基础。

参考文献

[1] 朱晓芹，王博龙. 金芪降糖片入血成分抗糖尿病机制的网络药理学研究[J]. 中国现代应用药学，2020，37(4)：431-436.
[2] 王 超，谢蓝华，杜 冰. 黄芪提取物的抑菌活性研究[J]. 饮料工业，2019，22(5)：13-16.
[3] 肖 倩，王展强，吴行贵，等. 黄芪、穿心莲单独或与抗菌肽LL-37联合应用对铜绿假单胞菌生物膜的影响[J]. 广州中医药大学学报，2019，36(4)：562-568.
[4] 赵英妹，乔 昀. 8种中草药临床常见菌株体外抑菌活性分析[J]. 检验医学，2019，34(11)：987-990.
[5] 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，2015：140-151.
[6] 胡亚英，马 欣，陈 睿，等. 复黄片微生物限度检查方法适用性探究[J]. 中成药，2020，42(3)：788-791.
[7] 庞云娟，樊文研，刘康连，等. 珍黄胶囊微生物限度检查方法适用性试验的研究[J]. 中成药，2018，40(3)：711-715.
[8] 刘小静，王亚婷，刘建芬，等. 肝素钠微生物限度检查方法适用性研究[J]. 中国抗生素杂志，2018，43(12)：1533-1537.
[9] 刘 鑫，欧阳丽影. 六味地黄丸（水蜜丸）微生物限度检查法适用性试验研究[J]. 黑龙江医药，2017，30(4)：718-721.
[10] 朱 洁. 行气利水合剂的制备工艺和质量控制研究[D]. 苏州：苏州大学，2017.
[11] 陈 洁，周 剑. 磷酸苯丙哌林胶囊微生物限度检查方法适用性试验[J]. 今日药学，2017，27(4)：240-243.
[12] 吴 鑫. 10种中药饮片微生物限度检查方法的建立及污染的研究[D]. 杭州：浙江工业大学，2017.
[13] 王永智，吴宏斌，邱文娜，等. 人工牛黄微生物限度检查方法适用性实验[J]. 医药导报，2019，38(3)：380-381.
[14] 杨瑞琦，王 西，陈慧荣. 肉豆蔻饮片微生物计数检查方法研究及其在霉变过程中菌落总数的测定[J]. 世界科学技术-中医药现代化，2019，21(2)：248-253.
[15] 李 艳，周 剑，刘 霞. 6种中药饮片微生物检测状况分析[J]. 中国药业，2020，29(9)：117-120.

（收稿日期：2020-06-22；修回日期：2020-09-27）