中国药业
China Pharmaceuticals
2021年2月20日 第30卷第4期
Vol. 30, No. 4, February 20, 2021

doi:10.3969/j.issn.1006－4931.2021.04.016

复方气管炎片微生物限度检查方法适用性研究

闵 朕,卫延明,杜思迪

(陕西省渭南市食品药品检验所,陕西 渭南 714000)

摘要:目的 建立复方气管炎片的微生物限度检查方法。**方法** 分别采用平皿法及薄膜过滤法,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供试液接种至不同体积的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的适用性试验。**结果** 需氧菌总数(TAMC)的计数采用平皿法(1∶20供试液)联用薄膜过滤法(1∶20供试液),霉菌和酵母菌总数(TYMC)的计数采用平皿法(1∶10供试液),各试验菌回收率均符合要求,控制菌检查采用培养基用量为500 mL的稀释法符合要求。**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复方气管炎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:复方气管炎片;微生物限度;抑菌;计数方法;适用性

中图分类号:R932;R284.1;R286.0 **文献标志码:**A **文章编号:**1006－4931(2021)04－0060－03

Applicability of Microbiological Limit Test for Compound Bronchitis Tablets

MIN Zhen, WEI Yanming, DU Sidi

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

Abstract: Objective To establish a microbiological limit test method for Compound Bronchitis Tablets. **Methods** The plate method and membrane filtration method were used to test the applicability of counting method by adding *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans* and *Aspergillus niger* and 10 mL of 1∶10 test solution was inoculated into different volumes of trypsin soybean peptone liquid medium, and *Escherichia coli* was inoculated to carry out the applicability test of the detection method of controlled bacteria. **Results** The total aerobic microbial count(TAMC) was counted by plate method(1∶20 test solution) combined with membrane filtration method(1∶20 test solution), and the total yeasts and molds count(TYMC) was counted by plate method(1∶10 test solution). The recovery rate of each test bacteria met the requirements, and the dilution method with 500 mL culture medium for controlled bacteria met the requirements. **Conclusion** The microbial counting method combined with plate method and membrane filtration method can effectively remove the antibacterial effect of microorganisms in Compound Bronchitis Tablets, which is conducive to the detection of potential contaminated microorganisms.

Key words: Compound Bronchitis Tablets; microbial limit; bacteriostasis; counting method; applicability

中药饮片的微生物污染严重[1－2],微生物限度检查是保障其安全性的重要措施。微生物方法适用性的本质就是建立对样品影响更小、操作得率更高的方法[3]。去除药品的抑菌性是微生物限度检查方法适用性试验的重点和难点,也是避免出现假阴性结果的重要环节[4]。中药种类多,相互关系复杂[5],清热药、泻下药等均具有抑菌性[6],加之中西医抑菌药物联用具有抗菌增敏作用[7－8],其抑菌作用较强,故建立具有抑菌性的中药制剂的微生物限度检查方法较困难。复方气管炎片临床多用于治疗急慢性支气管炎、咳嗽等症,具有中药和西药的多种抑菌成分,抑菌性强且不易去除,建立微生物限度检查方法难度较大。本研究中采取平皿法、稀释法、薄膜过滤法及多法联用的方式进行渐进式研究,建立了复方气管炎片的微生物限度检查方法。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 仪器、材料与菌种

仪器:BS2202S型电子天平(德国Sartorius公司),PB－10型pH酸度计(赛多利斯科学仪器<北京>有限公司);VITEK2 Compact型全自动微生物生化鉴定系统(法国BioMérieux公司);HFsafe－1200LC型生物安全柜(上海力申科学仪器有限公司);LRH－250型生化培养箱(上海一恒科学仪器有限公司);WJ－6型无菌检查仪(天津市罗根科技有限公司);OLYMPUS－CH型显微镜(日本Olympus公司);涡旋混合器(德国IKA公司);FC752型薄膜过滤器(杭州泰林生物技术设备有限公司)。

样品及培养基:复方气管炎片(陕西春晖药业有限公司,批号为190706,规格为每片0.35 g);胰酪大豆胨琼脂(TSA)培养基、沙氏葡萄糖琼脂(SDA)培养基、胰酪大豆胨液体(TSB)培养基、沙氏葡萄糖液体(SDB)培养基、麦康凯液体培养基、麦康凯琼脂培养基,均购自北京

第一作者:闵朕,男,大学本科,主管药师,研究方向为药品微生物检验及标准,(电子信箱)404706292@qq.com。

陆桥技术有限责任公司，适用性检查结果符合 2015 年版《中国药典（四部）》通则要求；pH 7.0 氯化钠蛋白胨缓冲液、0.9% 无菌氯化钠溶液按 2015 年版《中国药典》要求配制和灭菌。

菌种：大肠埃希菌（*Escherichia coli*）[CMCC（B）44102]、金黄色葡萄球菌（*Staphylococcus aureus*）[CMCC（B）26003]、铜绿假单胞菌（*Pseudomonas aeruginosa*）[CMCC（B）10104]、枯草芽孢杆菌（*Bacillus subtilis*）[CMCC（B）63501]、白色念珠菌（*Candida albicans*）[CMCC（F）98001]、黑曲霉（*Aspergillus niger*）[CMCC（F）98003]，均来自中国医学细菌保藏管理中心，工作用菌株为新鲜制备的第 3 代菌悬液。

1.2 方法

1.2.1 供试液制备

取样品 10 g，精密称定，加入 100 mL TSB 培养基中，45 ℃水浴恒温振摇 15 min，混匀，静置 15 min，制成 1∶10 供试液；取 50，20 mL，分别加入含 50，80 mL TSB 培养基无菌瓶中，混匀，制得 1∶20，1∶50 供试液。

1.2.2 计数方法适用性试验

平皿法：试验组，取上述 3 种供试液，分别装满 5 个 9.9 mL 无菌试管，再分别加入新鲜制备的含菌量不大于 10^4 cfu/mL 的金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、枯草芽孢杆菌、白色念珠菌、黑曲霉菌液各 0.1 mL。对照组，取制备好的 1∶10 供试液 9.9 mL，加入 0.1 mL TSB 培养基。菌液组，取 TSB 培养基分装于 5 个 9.9 mL 无菌试管，其后操作同试验组。分别取 1 mL 供试液，置直径为 90 mm 或 150 mm 的无菌平皿中，加入不超过 45 ℃的 TSA 培养基或 SDA 培养基约 20 mL 或 50 mL。待各平皿中的液体凝固后，分别按规定培养条件培养并计数。

薄膜过滤法：试验组，取 1∶20 供试液 1 mL，加入含 100 mL pH 7.0 氯化钠蛋白胨缓冲液的输液瓶，薄膜过滤，用 pH7.0 氯化钠蛋白胨缓冲液冲洗 3 次，每次 100 mL。在最后一次冲洗液中分别加入含菌量不大于 100 cfu/mL 的上述菌液 1 mL。对照组，取制备好的 1∶20 供试液 1 mL，不加试验菌，其余操作同试验组。菌液组，除不加供试液外，其余操作同试验组。制备好的滤膜，菌面朝上贴于 TSA 培养基上，按规定条件倒置培养，计数。

以上 2 种方法中，各试验菌的回收率为试验组平均菌落数与对照组平均菌落数之差除以菌液组平均菌落数的值。若均为 0.5～2.0，则判定方法通过。

1.2.3 控制菌检查方法适用性试验

试验组，分别取 1∶10 供试液 10 mL，分别接种至 100，200，500 mL TSB 培养基中，同时分别加入含菌量不大于 100 cfu/mL 的大肠埃希菌 1 mL，混匀，35 ℃条件下培养 18 h，取上述培养物 1 mL，接种至 100 mL 麦康凯液体培养基中，42 ℃条件下培养 24 h。取麦康凯液体培养物划线接种于麦康凯琼脂培养基上，35 ℃条件下培养 18 h，以全自动微生物生化鉴定系统鉴定、确认。阴性对照组，除不加试验菌外，其余操作同试验组。阳性对照组，除不加供试液外，其余操作同试验组。平行检测 3 次。

若检出并确认为大肠埃希菌，则可采用供试液制备方法及检查法进行供试品的大肠埃希菌检查。

2 结果

2.1 计数方法适用性

结果见表 1。需氧菌总数（TAMC）计数方法的适用性研究结果表明，平皿法（1∶10 供试液）和稀释法（1∶20，1∶50 供试液）均不能有效去除供试液对金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌的抑制作用，回收试验失败；采用 1∶10 供试液薄膜过滤会导致滤膜堵塞，无法过滤；采用 1∶20 供试液平皿法与薄膜过滤法联用的方式可过滤，且各试验菌回收率均在 0.5～2.0 之间，符合 2015 年版《中国药典》的要求。

表 1 样品微生物计数法回收试验（$n=3$）

Tab. 1 Recovery test of the method for counting the microorganisms in a sample（$n=3$）

试验菌	次数	需氧菌总数（平皿法，1∶10）	霉菌和酵母菌总数			
			平皿法（1∶10）	平皿法（1∶20）	平皿法（1∶50）	薄膜过滤法（1∶50）
铜绿假单胞菌	1	0.96				
	2	0.99				
	3	0.92				
金黄色葡萄球菌	1	0.01		0.03	0.11	0.82
	2	0.05		0.05	0.17	0.89
	3	0.02		0.01	0.03	0.87
枯草芽孢杆菌	1	0.01		0.11	0.21	0.67
	2	0.02		0.10	0.13	0.75
	3	0		0.05	0.08	0.72
白色念珠菌	1	0.90	0.89			
	2	0.83	0.92			
	3	0.82	0.90			
黑曲霉	1	0.77	0.81			
	2	0.74	0.85			
	3	0.68	0.78			

霉菌和酵母菌总数（TYMC）的计数方法适用性研究结果表明，可采用 1∶10 供试液平皿法进行霉菌和酵母菌总数的检查，各试验菌回收率均在 0.5～2.0 之间，符合 2015 年版《中国药典》的要求。

2.2 控制菌检查方法适用性

结果见表 2。采用 1∶10 供试液 10 mL 分别接种至 100，200 mL TSB 培养基中，试验菌均无法恢复生长，说明其无法有效去除供试液的抑菌性。采取 1∶10 供试液

表2 样品控制菌检查方法适用性试验结果（$n=3$）

Tab. 2 The results of applicability test of the detection method of controlled bacteria test（$n=3$）

体积	第1次试验			第2次试验			第3次试验		
（mL）	试验组	阳性对照组	阴性对照组	试验组	阳性对照组	阴性对照组	试验组	阳性对照组	阴性对照组
100	−	+	−	−	+	−	−	+	−
200	−	+	−	−	+	−	−	+	−
500	+	+	−	+	+	−	+	+	−

注：+表示检出并确认为大肠埃希菌，−表示未检出。

Note: + indicates that *Escherichia coli* is detected and confirmed, − indicates that no controlled bacteria are detected.

10 mL接种至500 mL TSB培养基中进行方法适用性研究，大肠埃希菌在麦康凯琼脂培养基上的表型为表面光滑、湿润，桃红色圆形菌落，显微镜下观察结果为革兰阴性杆菌，两端钝圆，无芽孢。经系统确认为大肠埃希菌，表明该方法可用于样品的控制菌检查。

3 讨论

复方气管炎片的处方由瓜蒌、葶苈子、陈皮、茯苓、甘草、甲氧苄啶、盐酸异丙嗪、磺胺甲噁唑等组成，其中磺胺甲噁唑和甲氧苄啶复方为中效磺胺类药，且为广谱抑菌剂，对革兰阳性菌（如金黄色葡萄球菌）、革兰阴性菌（如大肠埃希菌）均有较强的抗菌活性。瓜蒌中的瓜蒌子挥发油、瓜蒌皮总皂苷等对金黄色葡萄球菌有抑制作用[9]，陈皮中的双氢川陈皮素、川陈皮素具有抗炎、抗菌、抗氧化等药理作用[10]。甘草中的黄酮类化合物也有一定抑菌性[11]。因此，复方气管炎片对金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、大肠埃希菌等试验菌表现出较强的抑菌性。

具有抑菌作用的中药与西药复方制剂协同产生的较强且难以去除的抑菌性是建立复方气管炎片微生物限度检查法的主要障碍。本试验在进行TAMC方法适用性研究时采用了平皿（直径150 mm）法联合稀释法，但无法完全去除抑菌性。采用中和法联合稀释法（即1∶50供试液100 mL中加入对氨基苯甲酸溶液1 mL）仍无法去除对金黄色葡萄球菌的抑菌性，因此改用薄膜过滤法。对中药制剂进行方法适用性研究时，供试品中常存在较多药渣，采用薄膜过滤法易产生滤膜堵塞的问题[12－14]，限制了该方法的应用。因此，改用稀释法联合薄膜过滤法对TAMC进行方法适用性试验。

中药制剂的理化性质和生物活性的特殊性，使在建立微生物限度检查法时常需联用药典要求的常用检测方法[15]，如采用稀释法和薄膜过滤法以消除其抑菌性[16]。稀释法能有效清除抑菌成分，达到检验目的[17]，稀释法和薄膜过滤法本质上都是降低或去除抑菌成分的抑菌性对检查结果的干扰，避免假阴性结果的产生[18]。本研究中联用2种方法，有进一步去除抑菌性和易于过滤的优点，为建立具有较强抑菌性的中西药复方制剂的微生物限度检查方法提供了新思路。

参考文献

[1] 邓海英，龚勇祥，李连凤，等. 中药饮片微生物污染现状及典型菌鉴定研究进展[J]. 中草药，2019，50(9)：2242－2250.
[2] 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.
[3] 马仕洪，刘 鹏，杨利红，等. 药品微生物限度检查方法适用性试验中加菌方式的实验研究[J]. 药物分析杂志，2018，38(5)：877－882.
[4] 杨晓莉，李 辉，马英英，等. 中国药典2015年版非无菌产品微生物限度检查：微生物计数法解读[J]. 药物分析杂志，2016，36(6)：1101－1107.
[5] 滕 钰，薛咏兰，黄 婕，等. 7组同名异型中成药微生物限度检查方法[J]. 中成药，2019，41(10)：2473－2477.
[6] 林真亭，隋华秀，王皇斌. 中药抗菌活性的研究进展[J]. 海峡药学，2019，31(10)：57－60.
[7] 翟贯星，陆 璐，陈代杰，等. 中药化合物的抗菌及增效作用[J]. 中国抗生素杂志，2019，44(12)：1366－1370.
[8] 汤嘉文，李培源. 中药抗菌活性及作用机制研究[J]. 山东化工，2019，48(20)：78－81.
[9] 和焕香，郭庆梅. 瓜蒌化学成分和药理作用研究进展及质量标志物预测分析[J]. 中草药，2019，50(19)：4808－4820.
[10] 黄秀芳，庾国桢，童晶晶. 基于网络药理学分析陈皮的药理作用机制[J]. 中成药，2019，41(12)：3038－3045.
[11] 李 冀，李 想，曹明明，等. 甘草药理作用及药对配伍比例研究进展[J]. 上海中医药杂志，2019，53(7)：83－87.
[12] 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.
[13] 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.
[14] 倪玉佳，汤 露，戈 煜，等. 四种含抑菌成分外用制剂微生物限度检查方法验证[J]. 东南国防医药，2020，22(1)：52－55.
[15] 傅 钰，覃存轩. 他克莫司微生物限度方法学的研究[J]. 药物分析杂志，2019，39(8)：1527－1532.
[16] 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.
[17] 邓 莉，周 剑，胡 婧，等. 茵丹颗粒微生物限度检查方法学验证[J]. 中国药业，2019，28(11)：47－49.
[18] 卫延明，陈子龙，闵 朕，等. 三种西药制剂微生物限度检查方法适用性试验的研究[J]. 海峡药学，2020，32(1)：59－62.

（收稿日期：2020－06－18；修回日期：2020－07－25）