

眼疲宁合剂微生物限度检查法的建立与验证

袁清照, 吴劲松, 胥 骞, 杨 莹, 刘瑞连, 田其学*

湖南省中医药研究院, 湖南 长沙 410013

摘要: 目的 探索建立眼疲宁合剂有效可控的微生物限度检查方法。方法 选取不同阳性菌种进行方法学试验, 并对本制剂进行培养基稀释法及薄膜过滤法两种方法比较研究。结果 确立用枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、白色念珠菌及黑曲霉作为阳性菌种进行方法学试验; 确立需氧菌检查采取薄膜过滤法、霉菌酵母菌检查采取培养基稀释法, 并验证了控制菌大肠埃希菌计数实验用培养基的量。结论 确立了眼疲宁合剂的微生物学检查方法及质量标准, 可有效控制制剂的卫生学质量。

关键词: 中药复方; 眼疲宁合剂; 微生物学检查; 方法学验证

中图分类号: R969 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2019) 09-1785-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2019.09.013

Establishment and validation of microbial limit test method of Yanpinging Liquid Preparations

YUAN Qingzhao, WU Jingsong, XU Qian, YANG Ying, LIU Ruilian, TIAN Qixue

Hunan Academy of Chinese Medicine, Changsha 410013, China

Abstract: Objective The formulation has complex composition and the strong antibacterial activity, so its quite essential to establish the microbial limit test for Yanpinging Liquid Preparations through the experiments. **Methods** we select different positive strains tested methodology and microbial limit tests were validated. comparative studies have been carried out between culture medium dilution method and membrane filtration. **Results** Experiments verified by *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* and *Aspergillus niger* as positive strains tested methodology and results show that the former method could be used for mold and yeast counting test; the latter could be used for total aerobic bacteria counting of the preparations; The amount of culture medium for *Escherichia coli* count experiment was verified. **Conclusion** Microbial limit tests has the good reference value and the confirmed experimental results could effectively control the hygiene quality of for Yanpinging Liquid Preparations.

Key words: Chinese herbal compound prescription; Yanpinging Liquid Preparations; microbial limit test; methodology validation

眼疲宁合剂系湖南省中医药研究院名老中医经验方所开发的医院制剂, 临床应用历史悠久, 功效显著。其有养血益精、理气健脾、清肝明目之功效, 临床常用于屈光不正、青光眼、白内障、陈旧性视网膜膜炎等病症所致的眼疲劳等病症。该制剂处方中含有夏枯草、菊花等多味清肝散结、清热解毒类中药, 药理作用显示其具有抗病原微生物、抗炎作用^[1-2], 故初步推断该制剂有一定的抑菌作用, 常规法不能适用。本文选取不同阳性菌种进行方法

学比较, 确立用枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、白色念珠菌及黑曲霉作为阳性菌种进行方法学试验; 并对制剂进行培养基稀释法及薄膜过滤法两种方法比较研究, 最终确立眼疲宁合剂微生物限度检查方法及质量标准。

1 仪器与实验材料

1.1 仪器

LS-150LD 型立式压力蒸汽灭菌器 (江阴滨江医疗设备); HH 型数显恒温水浴锅 (常州恒隆仪

收稿日期: 2018-11-16

基金项目: 全国中药炮制技术湖南省中医药研究院附属医院传承基地(2016年); 湖南省名老中医药专家黄柏良传承工作室(2017年)

第一作者: 袁清照, 女, 主管药师, 研究方向为中药新制剂与质量新评价。Tel: 13873137248 E-mail: qzyuan601@qq.com

*通信作者: 田其学, 主任中药师。E-mail: 1354839972@qq.com

器);MJX-150B型细菌培养箱(上海予卓设备);SPX-150B型霉菌生化培养箱(上海予卓设备)。

1.2 样品

眼疲宁合剂(批号20170801、20170605、20170419,规格100 mL)

1.3 实验菌株

大肠埃希菌 *Escherichia coli* [CMCC (B) 44102]; 枯草芽孢杆菌 *Escherichia coli* [CMCC (B) 63501]; 铜绿假单胞菌 *Pseudomonas aeruginosa* [CMCC (B) 10104]; 金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* [CMCC (B) 26003]; 白色念珠菌 *Candida albicans* [CMCC (F) 98001]; 黑曲霉 *Aspergillus niger* [CMCC (F) 98003]。

1.4 培养基

胰酪大豆胨液体培养基(批号3105365)、胰酪大豆胨琼脂培养基(批号3105757)、沙氏葡萄糖琼脂培养基(批号3105710)3种培养基均由广东环凯微生物科技有限公司生产;沙氏葡萄糖液体培养基(批号20151028),由北京奥博星生物技术有限公司生产。

2 方法及结果

2.1 菌液制备

接种枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌的新鲜培养物至胰酪大豆胨液体培养基中,30~35 °C培养18~24 h,取此培养物用0.9%无菌氯化钠溶液稀释制成适宜浓度的菌悬液。接种白色念珠菌的新鲜培养物至沙氏葡萄糖液体培养基中,20~25 °C培养2~3 d,取此培养物用0.9%无菌氯化钠溶液稀释制成适宜浓度的菌悬液。接种黑曲霉的新鲜培养物至沙氏葡萄糖琼脂斜面培养基中,20~25 °C培养5~7 d,加入3~5 mL含0.05%聚山梨酯80的0.9%无菌氯化钠溶液洗下霉菌孢子,吸取孢子悬液至无菌试管内,用含0.05%聚山梨酯80的0.9%无菌氯化钠溶液稀释制成适宜浓度的黑曲霉孢子悬液。

2.2 供试液制备

取供试品10 g,加入胰酪大豆胨液体培养基至100 mL,置45 °C水浴中,振摇,制成1:10的供试液。

2.3 需氧菌总数计数方法适用性试验

2.3.1 试验组 采用薄膜过滤法。分别取1:10的供试液1 mL,加入100 mL pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液中,混匀,过滤。用100 mL pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液加入不大于100 cfu的试验菌液冲洗滤膜1次。滤干,滤膜菌面朝上贴于胰酪胨大

豆琼脂培养基平板上,铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌置30~35 °C温度培养3 d,白色念珠菌、黑曲霉置30~35 °C温度培养5 d,计数。

2.3.2 菌液对照组 取稀释液替代供试液,按试验组操作加入试验菌液。

2.3.3 供试品对照组 取制备好的供试液,以稀释液代替菌液同试验组操作。

2.3.4 结果 实验表明,本品经采用薄膜过滤法(冲洗量100 mL/膜),各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均在0.5~2,该法适合本品需氧菌总数计数,微生物回收试验结果见表1。

2.4 霉菌和酵母菌总数计数方法适用性试验

2.4.1 试验组 采用培养基稀释法(0.2 mL/皿)。分别取1:10的供试液9.9 mL,加入0.1 mL试验菌液,充分混匀,使1 mL供试液中含菌量不大于100 cfu。然后,取上述溶液1 mL,等量分注于5个直径为90 mm的无菌平皿,注入15~20 mL温度不超过45 °C融化的沙氏葡萄糖琼脂培养基,混匀,凝固,倒置培养。试验菌株为白色念珠菌、黑曲霉,置20~25 °C温度培养5 d。计数。每1 mL分注5个平皿中生长菌落数之和即为该1 mL供试液的菌落数,计算每毫升的平均菌落数。

2.4.2 菌液对照组 取稀释液替代供试液,按试验组操作加入试验菌液。

2.4.3 供试品对照组 取制备好的供试液,以稀释液代替菌液同试验组操作。

2.4.4 结果 实验表明,本品经采用培养基稀释法(0.2 mL/皿),各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均在0.5~2,该法适合本品霉菌和酵母菌总数计数,微生物回收试验结果见表2。

2.5 控制菌(大肠埃希菌)检查方法适用性试验

2.5.1 菌液制备 接种大肠埃希菌的新鲜培养物至胰酪大豆胨液体培养基中,30~35 °C培养18~24 h,取此培养物用0.9%无菌氯化钠溶液稀释至菌数约为不大于100 cfu/mL。

2.5.2 试验组 取供试品10 g,加入胰酪大豆胨液体培养基至100 mL,置45 °C水浴中,振摇,制成1:10的供试液。取1:10供试液10 mL和不大于100 cfu的大肠埃希菌液,接种至100 mL胰酪大豆胨液体培养基中,混匀,30~35 °C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,42~44 °C培养24 h。取麦康凯液体培养物划线接

表1 需氧菌总数微生物回收试验结果

Table 1 Microbial recovery test results of total aerobic bacteria

菌种名称	批次	试验组/cfu	菌液对照组/cfu	供试品对照组/cfu	回收比值
铜绿假单胞菌	1	61	71	1	0.89
	2	66	68	1	
	3	64	71	1	
	平均	63.5	70	1	
金黄色葡萄球菌	1	56	59	1	0.98
	2	56	51	1	
	3	53	55	1	
	平均	55	55	1	
枯草芽孢杆菌	1	24	34	1	0.83
	2	27	31	1	
	3	27	25	1	
	平均	26	30	1	
白色念珠菌	1	85	88	1	1.02
	2	86	85	1	
	3	90	82	1	
	平均	87	85	1	
黑曲霉	1	26	20	1	1.04
	2	25	25	1	
	3	24	24	1	
	平均	25	23	1	

表2 霉菌和酵母菌总数微生物回收试验结果

Table 2 Microbial recovery test results of total fungi and yeasts

菌种名称	批次	试验组/cfu	菌液对照组/cfu	供试品对照组/cfu	回收比值
白色念珠菌	1	88	90	0	0.99
	2	86	87	0	
	3	84	84	0	
	平均	86	87	0	
黑曲霉	1	23	23	0	1.04
	2	25	25	0	
	3	27	24	0	
	平均	25	24	0	

种于麦康凯琼脂培养基平板上,30~35°C培养18 h。取麦康凯琼脂培养基平板上的可疑菌落进行分离、纯化和鉴定。

2.5.3 阳性对照组 除不加供试液,其余操作同试验组。

2.5.4 阴性对照组 取胰酪大豆胨液体培养基10 mL,除不加阳性菌液,余下操作同试验组。

2.5.5 结果 采用100 mL胰酪大豆胨液体培养基进行供试品大肠埃希菌检查,方法可行。实验结果见表3。

表3 大肠埃希菌检查方法适用性试验结果

Table 3 Test results of applicability of *E. coli* test methods

项目	试验组	阳性对	阴性对
		照组	照组
100 mL胰酪大豆胨液体培养基	+	+	-
麦康凯液体培养基	+	+	-
麦康凯琼脂培养基	+	+	-
鉴定试验	+	+	-

2.6 结论

根据上述微生物计数和控制菌检查方法适用

性试验结果,确定本品微生物限度检查方法如下:取供试品 10 g,加入胰酪大豆胨液体培养基至 100 mL,置 45 °C 水浴中,振摇,制成 1:10 的供试液。照《中国药典》2015 年版四部非无菌产品微生物限度检查通则进行微生物限度检查。其中采用薄膜过滤法(冲洗量 100 mL/膜)测定需氧菌总数;采用培养基稀释法(0.2 mL/皿)测定霉菌和酵母菌总数;取供试品 10 g,加入胰酪大豆胨液体培养基至 100 mL,置 45 °C 水浴中,振摇,制成 1:10 的供试液。取 1:10 供试液 10 mL,加至 100 mL 胰酪大豆胨液体培养基中,按《中国药典》2015 年版四部非无菌产品控制菌检查法进行控制菌(大肠埃希菌)检查^[3]。

3 讨论

在研究中药复方制剂的微生物学检验方法和质量标准过程中,要注重处方中各成分的理化性质、生物学特性及相互作用研究,并根据特性严格筛选实验方法。某一或某些中药成分的抑菌作用

都可能影响制剂微生物限度检查的准确性,确定微生物限度检查方法是中药制剂质量控制的重要内容^[4]。本文在考察本文需氧菌总数计数方法适用性试验中,前期进行了培养基稀释法与薄膜过滤法的比较研究,结果表明培养基稀释法虽简易,但回收率不太理想,最终确定了用薄膜过滤法进行需氧菌总数的计数。本文对眼疲宁合剂微生物限度检查方法进行了考察、验证和建立,对于制剂的卫生学控制及质量标准建立具有很好的参考价值。

参考文献

- [1] 顾晓洁, 钱士辉, 李友宾, 等. 夏枯草的化学成分及药理作用研究进展 [J]. 中国野生植物资源, 2007, 26(2): 5-7.
- [2] 瞿璐, 王涛, 董勇喆, 等. 菊花化学成分与药理作用的研究进展 [J]. 药物评价研究, 2015, 38(1): 98-104.
- [3] 中国药典 [S]. 四部. 2015.
- [4] 杨育儒, 沈秋莲, 王庆芬. 6 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.