

仙阳壮肾胶囊微生物限度检查的方法学验证

熊青*, 李香斌, 谭小辉

(南昌市男科医院, 南昌 330001)

[摘要] 目的: 建立仙阳壮肾胶囊的微生物限度检查方法。方法: 采用直接接种法和培养基稀释法测定仙阳壮肾胶囊对验证菌株的回收率, 并对控制菌检查法进行验证。结果: 仙阳壮肾胶囊以直接接种法检查大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、黑曲霉菌的菌回收率 > 70%, 采用培养基稀释法检查枯草芽孢杆菌、白色念珠菌的菌回收率 > 70%。结论: 该方法消除了样品的抑菌性, 可用于该品种的微生物限度检查。

[关键词] 仙阳壮肾胶囊; 微生物限度检查; 方法验证

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)22-0086-04

Verification of Methodology on Microbial Limit Test for Xianyang Zhuangshen Capsule

XIONG Qing*, LI Xiang-bin, TAN Xiao-hui

(Nanchang Hospital of Andrology, Nanchang 330001, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a method for the microbial limit test of Xianyang Zhuangshen capsule. **Method:** Verified by the experiment with directly inoculated and culture diluting method, and measured the percentage recovery of bacterium. **Result:** The medicine had no antimicrobial effect with *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Aspergillus niger*. The medium dilution method can eliminate restraining effect of *Candida albicans* and *Bacillus subtilis*. **Conclusion:** It can eliminate the antimicrobial properties, and it can be used for the microbial limit test for Xianyang Zhuangshen capsule.

[Key words] Xianyang Zhuangshen capsule; microbial limit test; validation of the method

仙阳壮肾胶囊是本院临床经验方, 由炙黄芪、淫羊藿、锁阳、菟丝子、巴戟天、仙茅、蜈蚣等 13 味中药饮片加工制成, 具有温肾补阳、活血起痿的功能。用于性欲低下、勃起不坚、全身乏力、盗汗、腰膝酸软等症, 适用于中老年肾阳虚伴血瘀的患者。由于仙阳壮肾胶囊在生产工艺中进行了醇沉工序, 乙醇具有一定的抑菌活性, 且含有淫羊藿和郁金等具有抑菌作用的中药, 为了保证微生物限度检查结果的准确性, 更好的控制仙阳壮肾胶囊的质量, 按照《中国药典》2010 年版的要求^[1], 我们对仙阳壮肾胶囊的微生物限度检查方法进行验证。

1 材料

1.1 培养基 营养肉汤增菌液(批号 090622), 营养琼脂培养基(批号 090306), 玫瑰红钠琼脂培养基(批号 091104), 胆盐乳糖增菌液(批号 090302)。甘露醇氯化钠琼脂培养基(批号 091212), 溴化十六烷基三甲铵琼脂培养基(批号 091018)均购自中国生物制品检定所。

1.2 菌种 大肠埃希菌(*Escherichia coli*) [CMCC (B)44102] 第二代、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) [CMCC (B)26003] 第二代、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) [CMCC (B)63501] 第二代、白色念珠菌(*Candida albicans*) [CMCC (F)98001] 第二代、黑曲霉(*Aspergillus niger*) [CMCC (F)98003] 第二代。各菌株分别接种肉汤营养琼脂斜面, 培养 24 h, 黑曲霉培养 7 天, 分别用生理盐水分别将其稀释成

[收稿日期] 20110510(007)

[通讯作者] *熊青, 主管医师, 本科, 从事制剂开发, Tel: 0791-85200584

$10^{-5} \sim 10^{-10}$,取菌落数在 $50 \sim 100 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的菌稀释液,作为阳性菌对照液。

1.3 稀释液 pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液。

1.4 样品 仙阳壮肾胶囊(南昌市男科医院制剂室,批号 20100104)。

2 方法

2.1 直接接种法供试液的制备 称取供试品 10 g 3 份,加入 pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲溶液 90 mL,混匀,作为 1:10 供试液,取 1:10 供试液各 1 mL 加入置平皿中。

2.2 直接接种法加阳性菌供试液的制备 分别取 1:10 供试液各 1 mL 加入置平皿中,分别加入大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、白色念球菌、黑曲霉 $50 \sim 100$ 个/mL 的菌液 1 mL,作为加阳性菌供试液样。每种菌制备 3 份。

2.3 培养基稀释法供试品的的制备 取 1:10 供试液 0.2 mL,加入置平皿中,每组 5 个平皿,共 3 组。

2.4 培养基稀释法加阳性菌供试液的制备 分别取 1:10 供试液 0.2 mL,分别加入大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、白色念球菌、黑曲霉 $50 \sim 100$ 个/mL 的菌液 1 mL,每组 5 个平皿,每个菌株 3 组。

2.5 操作步骤

2.5.1 直接接种法 取 1:10 供试液 2 mL 注入平皿中,分别加入大肠埃希菌、枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌、白色念珠菌、黑曲霉 $50 \sim 100$ 个/mL 的菌液 1 mL,分别加入已溶化保温至 45°C 营养琼脂培养基(细菌),玫瑰红钠琼脂培养基(霉菌)20 mL,每个稀释度制备 2 个平皿。

2.5.2 培养基稀释法 分别取的 1:10 供试液样 0.2 mL,分别加入大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、白色念球菌、黑曲霉 $50 \sim 100$ 个/mL 的菌液 1 mL,每组 5 个平皿,每个菌株 3 组。分别加入已溶化保温至 45°C 营养琼脂培养基(细菌),玫瑰红钠琼脂培养基(霉菌)15 mL。每 1 mL 供试液所注的平皿中生长的菌数之和为 1 mL 菌落数,计算每 1 mL 供试液的平均菌落数,按平皿法计数规则报告菌落数。

2.5.3 阴性对照 各另取 pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲溶液 1 mL,分别注入 4 个平皿中,其中 2 个为细菌数阴性,2 个为霉菌数阴性。

2.5.4 大肠埃希菌检查 取 1:10 供试样液 10 mL

接种于胆盐乳糖培养基中,培养 24 h,取上述培养物 0.2 mL,接种至含 5 mL MUG 培养基的试管内,培养,于 5,24 h 在 365 nm 紫外线下观察,同时用未接种的 MUG 培养作本底对照。管内培养物呈现荧光,为 MUG 阳性;不呈现荧光,为 MUG 阴性。观察后,沿培养管的管壁加入数滴靛基质试验,液面呈玫瑰红色,为靛基质阳性;呈试剂本色,为靛基质阴性。本底对照应为 MUG 阴性和靛基质阴性。MUG 阳性、靛基质阳性,为检出大肠埃希菌;MUG 阴性、靛基质阴性,为未检出大肠埃希菌。取 $50 \sim 100$ 个/mL 的菌液 10 mL 按上述方法制备添加大肠埃希菌作为添加大肠埃希菌的供试品样;取 $50 \sim 100$ 个/mL 的菌液的大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌作为阳性菌对照管、阴性菌对照管;取 10 mL 氯化钠-蛋白胨缓冲溶液作为空白对照;必要时增加胆盐乳糖培养基的量。

2.5.5 沙门菌检查 取供试品 10 g,直接接种于营养肉汤培养基(200 mL 以上)中,混匀,培养 24 h。取上述培养物 1 mL,接种于含四硫磺酸钠亮绿培养基中,培养 24 h 后,分别划线接种于胆盐硫乳琼脂培养基的平板上,培养 24 h 以上。若平板上无菌落生长,或生长的菌落不同于沙门氏菌菌落形态特征,判供试品未检出沙门氏菌。若菌落与沙门氏菌菌落形态特征相同或疑似,用接种针接种典型或疑似菌落于三糖铁琼脂高层斜面上进行斜面 and 高层穿刺接种,培养 24 h,如斜面未见红色、底层未见黄色;或斜面黄色、底层无黑色,判供试品未检出沙门氏菌。否则,应取三糖铁琼脂培养基斜面的培养物进行适宜的生化试验和血清凝集试验,确认是否为沙门菌。取 $50 \sim 100$ 个/mL 的菌液 10 mL 按上述方法制备添加乙型付伤寒沙门菌作为添加沙门菌的供试品样;取 $50 \sim 100$ 个/mL 的菌液的乙型付伤寒沙门菌、大肠埃希菌作为阳性菌对照管、阴性菌对照管;取 10 mL 氯化钠-蛋白胨缓冲溶液作为空白对照;必要时增加营养肉汤培养基的量。

2.6 培养 各平皿培养基凝固后,细菌检查平皿置 $30 \sim 35^\circ\text{C}$ 培养箱 48 h,霉菌检查平皿置 $23 \sim 28^\circ\text{C}$ 培养箱中培养 72 h。

2.7 样品微生物限度测定 取供试品 10 g 3 份,加 pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲溶液 90 mL,混匀,按培养基稀释法进行操作。

3 结果

由表 1~4 的结果可见,对枯草杆菌、白色念球菌的检出均有影响,直接接种法金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、枯草芽孢杆菌、白色念球菌、黑曲霉菌各菌的其平均回收率分别为 82.6% ,78.7% ,66.7% ,

54.8% ,98.8% 。采用培养基稀释法各菌的其平均回收率分别为 87.0% ,90.8% ,83.3% ,79.0% ,97.7% ,均 >70% ,说明该方法适合于仙阳壮肾胶囊的细菌、霉菌及酵母菌计数,可按常规法进行控制菌检查。

表 1 直接接种法 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

项目	菌落数 (CFU/皿)			平均值 (CFU/皿)	添加量 (CFU/皿)	回收率 /%
	1	2	3			
供试品(细菌总数)	0	0	0	0	-	-
供试品(霉菌及酵母菌总数)	0	0	0	0	-	-
添加大肠埃希菌的供试品	77	68	82	76	92	82.6
添加金黄色葡萄球菌的供试品	47	52	56	52	66	78.7
添加枯草芽孢杆菌的供试品	50	49	57	52	78	66.7
添加白色念球菌的供试品	37	32	33	34	62	54.8
添加黑曲霉菌的供试品	86	84	89	86	87	98.8

表 2 培养基稀释法

项目	菌落数 (CFU/皿)			平均值 (CFU/皿)	添加量 (CFU/皿)	回收率 /%
	1	2	3			
供试品(细菌总数)	0	0	0	0	-	1
供试品(霉菌及酵母菌总数)	0	0	0	0	-	1
添加大肠埃希菌的供试品	80	75	84	80	92	87.0
添加金黄色葡萄球菌的供试品	63	57	60	60	66	90.8
添加枯草杆菌的供试品	64	71	60	65	78	83.3
添加白色念球菌的供试品	48	56	44	49	62	79.0
添加黑曲霉菌的供试品	85	86	85	85	87	97.7

表 3 大肠埃希菌检查

项目	增菌液	试验结果	结论
供试品组	未长菌		未检出
添加大肠埃希菌的供试品	长菌	阳性	检出大肠埃希菌
大肠埃希菌阳性	长菌	阳性	检出大肠埃希菌
阴性对照组	长菌	阴性	未检出
空白对照组	未长菌		未检出

表 4 沙门菌检查

项目	增菌液	试验结果	结论
供试品	未长菌		未检出
添加沙门菌的供试品	长菌	阳性	检出沙门菌
沙门菌阳性	长菌	阳性	检出沙门菌
阴性对照组	长菌	阴性	未检出
空白对照组	未长菌		未检出

4 讨论

由于生产仙阳壮肾胶囊过程中使用的乙醇有抑菌作用,且该制剂中含有淫羊藿和郁金,淫羊藿苷对于大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌具有很好的抑菌效果^[2],郁金挥发油对金黄色葡萄球菌、四联球菌、大肠埃希菌、产气杆菌、枯草杆菌均有明显抑制作用^[2],因此在检验时应排除其抑菌作用,通过取规定量的供试液,至较大的培养基中,使单位体积内的供试品量减少,至不含抑菌作用,使之不干扰细菌限度检查,结果方属有效。结果显示,采用培养基稀释法能消除抑菌作用,排除干扰,结果准确可靠。与直接接种法相比,培养基稀释法减少了供试品稀释次数,减少了操作程序,实验过程简便快速,同时对培养皿菌落进行加和计数,统计方法简单。但培养基稀释法所需的平皿数增加,因此需要配置较多的培养基。

炉甘石药材及饮片中氧化锌紫外-可见测定方法研究

杨连菊¹, 冯学锋¹, 徐子芳^{1,2}, 李尧尧^{1*}, 冯林敏³, 王剑平¹, 顾雪竹¹
(1. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700; 2. 江西中医学院, 南昌 330008;
3. 北京中医药大学 中药学院, 北京 100102)

[摘要] 目的: 建立炉甘石药材及饮片中氧化锌的紫外-可见测定方法。方法: 应用紫外-可见分光光度法测定 9 批药材和 13 批饮片中氧化锌的含量, 用锌试剂显色, 以标准曲线法计算含量。结果: 样品的平均回收率为 99.72%, RSD 1.85%。结论: 该方法准确、简便, 可重复性好, 适用于炉甘石药材及饮片的质量控制。

[关键词] 紫外-可见分光光度法; 炉甘石; 药材和饮片; 氧化锌

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)22-0089-03

Study on the Content of Zinc Oxide in Calamina Mineral Medicine and Pieces by Ultraviolet-visible Spectrophotometry

YANG Lian-ju¹, FENG Xue-feng¹, XU Zi-fang^{1,2}, LI Rao-rao^{1*},
FENG Lin-min³, WANG Jian-ping¹, GU Xue-zhu¹

(1. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Science, Beijing 100700, China;
2. Jiangxi College of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330008, China;
3. Institute of Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China)

[Abstract] **Objective:** To establish the UV spectrophotometry for the determining zinc oxide content in crude drug and processed pieces of Calamina. **Method:** Chromogenic method of zinc reagent was used. The content of zinc oxide in 9 batches of crude drug and 13 batches of processed pieces were determined by UV spectrophotometry. Standard curve method was used in the calculation of the content. **Result:** The average recovery rate of sample was 99.72% with RSD 1.85%. **Conclusion:** This method is accurate, simple for the determination of zinc oxide. It is suitable for quality control of Calamina herbs and pieces.

[Key words] UV-VIS spectrophotometry; Calamina; herbs and pieces; zinc oxide

[收稿日期] 20110612(006)

[基金项目] 科技部国家科技支撑计划(2008BAI55B02)

[第一作者] 杨连菊, 副研, 从事中药资源与质量研究工作, Tel: 010-643032656, E-mail: ylj0705@yahoo.com.cn

[通讯作者] *李尧尧, 博士, 副研究员, 从事中药炮制工作, Tel: 010-64014411-2975, E-mail: leeraorao@163.com

通过对仙阳壮肾胶囊进行细菌、霉菌及酵母菌计数方法及控制菌检查的验证研究, 仙阳壮肾胶囊可以使用直接接种法进行控制菌检查, 以培养基稀释法测定细菌总数、霉菌及酵母菌总数检查。

[2] 严赞开, 胡春菊. 淫羊藿甙的提取及抑菌作用[J]. 江苏农业科学, 2006, 4: 56.

[3] 公衍玲, 王宏波, 金宏. 郁金挥发油提取工艺及其抑菌活性研究[J]. 医药导报 2009, 2(28): 170.

[参考文献]

[责任编辑] 蔡仲德

[1] 中国药典. 一部[S]. 2010: 附录 XIIC.