

# 姜胆咳喘片微生物限度检查方法的验证

陈华龙<sup>1\*</sup>, 王莉蓓<sup>1</sup>, 谭莉萍<sup>2</sup>

(1. 韶关市药品检验所, 广东 韶关 512028; 2. 韶关学院医学院, 广东 韶关 512026)

**[摘要]** 目的: 建立姜胆咳喘片的微生物限度检查方法。方法: 参照《中国药典》2005 年版, 采用 5 种阳性对照菌回收率试验测定其是否含抑菌成分。结果: 该品种对金黄色葡萄球菌和枯草芽孢杆菌有抑菌活性, 采用离心沉淀集菌和培养基稀释联用的方法进行细菌数的测定, 采用常规法进行霉菌和酵母菌数的测定及控制菌的检查。结论: 用该法进行微生物限度检查, 可以客观地反映药物中微生物的污染状况, 可行性强, 能达到检测目的。

**[关键词]** 姜胆咳喘片; 微生物限度检查法; 培养基稀释法

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2010)11-0067-03

## Validation of Method for Microbial Limit Test of Jiangdan Kechuan Tablets

CHEN Hua-long<sup>1\*</sup>, WANG Li-bei<sup>1</sup>, TAN Li-ping<sup>2</sup>

(1. Shaoguan Institute for Drug Control, Shaoguan 512028, China;  
2. Medicine College of Shaoguan University, Shaoguan 512026, China)

**[Abstract]** **Objective:** To establish a method to determine the microbial limit test for Jiangdan Kechuan Tablets. **Method:** According to China Pharmacopoeia edition 2005, the antimicrobial effect of Jiangdan Kechuan Tablets was determined by recovery rate with 5 control trains. **Result:** Antibacterial effect was found against *Staphylococcus aureus* Rosenbach and *Bacillus subtilis* Cohn. Centrifuging medium and diluting method were used for counting bacteria. **Conclusion:** The method is simple, feasible and accurate.

**[Key words]** Jiangdan Kechuan Tablets; microbial limit test; methodology; dilution method

姜胆咳喘片由猪胆粉、干姜、白矾、白芥子等 10 味中药制成的复方中成药制剂, 具有祛风化痰, 止咳平喘功效。用于支气管哮喘, 慢性支气管炎。根据《中国药典》2005 年版的规定, 药品在进行微生物限度检查前必须对其检查方法进行验证, 以确认供试品所采用的检查方法无抑菌作用后再进行检查, 才能真实反映供试品受污染的程度<sup>[1]</sup>。试验证明姜胆咳喘片的细菌计数可采用离心沉淀集菌与培养基稀释联用的方法, 霉菌和酵母菌计数和控制菌检查采用常规法。

### 1 仪器与试药

**1.1 仪器** JJ200 电子天平(美国双杰兄弟集团有限公司); YJA 电动匀浆仪(台州市椒江五星机械仪

器有限公司); TDL-40B 型台式离心机(上海安亭科学仪器厂); LRH-250-II 生化培养箱(广东省医疗器械厂); LRH-250A 生化培养箱(韶关市泰宏医疗器械有限公司)。

**1.2 试药与培养基** 营养琼脂培养基(批号 080919), 玫瑰红钠琼脂培养基(批号 080606), 胆盐乳糖培养基(批号 080528), 营养肉汤培养基(批号 070111), pH 7.0 的无菌氢氧化钠-蛋白胍缓冲液(批号 070413), 改良马丁培养基(批号 080408), 均为中国药品生物制品检定所提供; 姜胆咳喘片(批号 080901, 韶关市居民制药有限公司)。

**1.3 菌种** 大肠埃希菌[CMCC(B)44102], 金黄色葡萄球菌[CMCC(B)26003], 枯草芽孢杆菌[CMCC(B)63501], 白色念珠球菌[CMCC(F)98001], 黑曲霉[CMCC(F)98003], 均由中国药品生物制品检定所提供。

**[收稿日期]** 20100324(005)

**[通讯作者]** \* 陈华龙, 主管药师, 从事药品检验工作, Tel: 0751-8736706, E-mail: xlongs006@126.com

## 2 方法与结果<sup>[2]</sup>

**2.1 菌液制备** 接种金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、枯草芽孢杆菌的新鲜培养物于营养肉汤培养基中,30℃~35℃培养 18~24 h;接种白色念珠菌的新鲜培养物至改良马丁培养基中,23℃~28℃培养 24~48 h,取上述培养物用 0.9% 无菌氯化钠溶液制成每 1 mL 含 50~100 CFU 的菌悬液。接种黑曲霉的新鲜培养物至改良马丁培养基斜面,培养 5~7 d,加入 5 mL 0.9% 氯化钠溶液,将孢子洗脱,然后吸出孢子悬液用 0.9% 无菌氯化钠溶液稀释制成含孢子 50~100 CFU 的孢子悬液。

**2.2 供试液的制备** 取本品 10 g,加 pH 7.0 氯化钠-蛋白胨缓冲液至 100 mL,用匀浆仪搅匀,制成 1:10 均匀供试液。

### 2.3 方法验证

#### 2.3.1 细菌、霉菌和酵母菌计数的验证

**2.3.1.1 试验组** ①常规法:取 2.2 项下制备的供试液 1 mL 和菌悬液 1 mL 注入 1 个灭菌平皿中,迅速倒入 15~20 mL 营养琼脂培养基,每个菌株做 2 mL,待凝。细菌在 30~35℃ 培养箱中培养 48 h;霉菌和酵母菌在 23~28℃ 培养箱中培养 72 h,点计菌落数。取均值。②离心沉淀集菌和培养基稀释联用的方法,取 2.2 项下制备的供试液 40 mL,分至 4 支灭菌离心管中,用 500 r·min<sup>-1</sup>,离心 5 min,取各管上层液,再用 3 000 r·min<sup>-1</sup>,离心 20 min,弃上清液,留下层沉淀 2 mL 加稀释液至 40 mL,摇匀。取此液 0.2 mL/皿和菌悬液 1 mL 注入 1 个灭菌平皿中,迅速倒入 15~20 mL 营养琼脂培养基,待凝。取上述供试液 2 mL 试验,培养时间与常规法相同。

**2.3.1.2 菌液组** 取菌悬液 1 mL 注入平皿中,测定加入的试验菌数,做 2 个皿,取均值。

**2.3.1.3 供试品** 对照组按实验组的方法,不加菌悬液,测定供试品菌数(本底菌)。

**2.3.1.4 稀释剂** 对照组取与供试液等量的稀释剂和菌悬液 1 mL 注入 1 个平皿中,培养基注皿,培养,计数。

试验组菌回收率 = (试验组菌落数 - 供试品对照组菌落数) / 试验组菌落数 × 100%

稀释剂对照组的菌回收率 = 稀释剂对照组菌落数 / 试验组菌落数 × 100%

《中国药典》规定对各试验菌株的回收率均不得低于 70%。用常规法测定该品种对 5 个试验菌株的回收率,以确定其抑菌程度。结果见表 1。

表 1 常规法测定各试验菌株的回收率 %

No.	大肠埃希菌	金黄色葡萄球菌	枯草芽孢杆菌	白色念珠菌	黑曲霉
1	88	65	54	83	89
2	82	59	52	91	96
3	91	57	46	94	92

由表 1 可知本品对大肠埃希菌、白色念珠菌和黑曲霉无抑菌作用,而对金黄色葡萄球菌和枯草芽孢杆菌有一定的抑菌活性。

采用离心沉淀集菌和培养基稀释联用的方法测定各试验菌株的回收率,结果见表 2。

表 2 离心沉淀集菌和培养基稀释联用的方法测定各试验菌株的回收率 %

方法	No.	大肠埃希菌	金黄色葡萄球菌	枯草芽孢杆菌	白色念珠菌	黑曲霉
常规法	1	85	86	76	90	87
	2	88	79	75	92	94
	3	81	84	79	84	90
离心沉淀 + 培养基稀释联用	1	89	85	84	89	96
	2	95	88	80	95	91
	3	93	87	89	93	97

由表 2 可知采用离心沉淀集菌和培养基稀释(0.2 mL/皿)联用的方法可有效消除药品对各试验菌株的抑菌作用。

#### 2.3.2 控制菌检查法的验证

**2.3.2.1 大肠埃希菌检查法的验证(常规法)** ①试验组取上述供试品溶液 10 mL 及大肠埃希菌菌液 1 mL(约含菌量 10~100 CFU)加入 100 mL 胆盐乳糖培养基中,于 35℃~37℃ 培养 24 h。②阴性菌对照组取上述供试品溶液 10 mL 及金黄色葡萄球菌菌液 1 mL(约含菌量 10~100 CFU)加入 100 mL 胆盐乳糖培养基中,于 35℃~37℃ 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 366 nm 紫外线下观察,同时用未接种的 MUG 培养基作本底对照。观察后,沿培养管的管壁加入数滴靛基质试液,观察。结果试验组检出,阴性组未检出。

**2.3.2.2 大肠菌群检查法的验证(常规法)** ①试验组:取 10 mL 的胆盐乳糖发酵培养基 1 支,加入 1:10 的供试液和大肠埃希菌菌液各 1 mL(约含菌量 10~100 CFU),于 35℃~37℃ 培养 24 h。②阴性

(下转第 72 页)

[4] Wang Y M, Kim P Y, Lantin E, et al. Dgradation and clearanee of methotrexate in children with osteosarcoma receiving highdose infusion [J]. Edic Pediat Oncology, 1978,4:221.

[5] 李黎波,李金翰,徐峰. 大剂量甲氨蝶呤静滴后解救剂甲酰四氢叶酸钙的个体化用药[J]. 实用癌症杂志, 1995,10(4):261.

[6] 叶辉,顾龙君,陈静,等. 儿童急性淋巴细胞白血病大剂量甲氨蝶呤治疗研究[J]. 中华血液学杂志,2001,22(7):385.

[7] 葛勇前,陆国春. HPLC 法测定人血浆中甲氨蝶呤的浓度[J]. 药物分析杂志,2001,21(6):418.

[责任编辑 顾雪竹]

### (上接第 68 页)

菌对照组:取 10 mL 的胆盐乳糖发酵培养基 1 支,加入 1:10 的供试液和金黄色葡萄球菌菌液各 1 mL (约含菌量 10~100 CFU),于 35℃~37℃培养 24 h。试验组检出,阴性组未检出。

**2.3.2.3 沙门菌检查法的验证(常规法)** ①试验组取供试液 10 mL 及 1 mL 沙门菌悬液加入 100 mL 营养肉汤培养基中,于 35℃~37℃培养 24 h。②阴性菌对照组取供试液 10 mL 及 1 mL 金黄色葡萄球菌悬液(约含菌量 10~100 CFU)加入 100 mL 营养肉汤培养基,于 35℃~37℃培养 24 h。试验组检出,阴性组未检出。

**2.4 结果** 姜胆咳喘片微生物限度检查方法试验结果为细菌计数采用离心沉淀集菌和培养基稀释联用的方法;霉菌和酵母菌计数采用常规法;控制菌检查采用常规法。

### 3 讨论

由于姜胆咳喘片是含有多种成分的复方中成药制剂,其中任何具有抑菌作用成分均可影响微生物

限度检查的准确性<sup>[3]</sup>。根据本品细菌计数常规法的结果,必须采取其他试验方法去除药物的抑菌作用从而真实反映药物受污染的程度。姜胆咳喘片中各味药多以生药粉入药,故考虑将制备好的供试品溶液采用离心沉淀集菌法来除去大部分药物的抑菌作用,结合培养基稀释法来提高菌落的检出率。

试验证明姜胆咳喘片对白色念珠菌和黑曲霉均无抑菌作用,故霉菌和酵母菌计数采用常规法。姜胆咳喘片对大肠埃希菌和沙门菌无抑菌作用,控制菌检查阳性对照组生长良好,阴性菌对照组未检出,故控制菌检查采用常规法。

### [参考文献]

[1] 马越,特玉香,杜平华,等. 16 种中成药微生物限度检查方法验证[J]. 中国药品标准,2005,6(6):12.

[2] 中国药典. 一部[S]. 2005:附录 71.

[3] 赵建英,李爱玲,陆蓓. 含黄芩中药成分微生物限度检查方法的验证[J]. 中国药业,2004,13(11):44.

[责任编辑 顾雪竹]