

复方丹参片微生物限度检查方法的验证

★ 龚玮 (江西省食品药品检验所 南昌 330029)

关键词:复方丹参片;微生物限度

中图分类号:R 446.5 文献标识码:B

复方丹参片为《中国药典》一部品种,功能与主治为活血化瘀,理气止痛。它由丹参、三七、冰片等三味中药组成,其中丹参具有较强的抑菌性,故必须采用适当的方法消除其抑菌性才能进行微生物限度的检查。通过研究,本文对细菌计数采用培养基稀释法,霉菌、酵母菌计数采用培养基稀释法,而大肠埃希菌和大肠菌群检查均采用常规法。并对方法进行验证,结果表明该方法有效可行。

1 仪器与试剂

YXQ-LS-50S II 高压蒸汽灭菌器(上海博迅实业医疗器械有限公司);D8523CTL-2W 格兰仕微波炉(顺德格兰仕微波炉电器有限公司);Sartorius T601-L 电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司);SW-CJ-2D 净化工作台(苏州净化有限公司);Heal Force-900C 生物安全柜(上海力申科学仪器有限公司);PYX-DHS 细菌培养箱(上海跃进医疗器械厂);MJ-160B 霉菌培养箱(上海跃进医疗器械厂);试验菌种:枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) [CMCC (B) 63501]、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) [CMCC (B) 26003]、大肠埃希菌(*Escherichia coli*) [CMCC (B) 44102]、白色念珠菌(*Candida albicans*) [CMCC (F) 98001]、黑曲霉(*Aspergillus niger*) [CMCC (F) 98003],由中国药品生物制品检定所提供。

胆盐乳糖发酵培养基、胆盐乳糖培养基、玫瑰红钠琼脂培养基、营养琼脂培养基、营养肉汤培养基、改良马丁液体培养基、改良马丁琼脂培养基、曙红亚甲蓝琼脂培养基,由北京三药科技开发公司提供。

2 方法^[1]与结果

2.1 菌液制备 取经 35℃ 培养 18~24 小时的金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、大肠埃希菌的新鲜营养肉汤培养物 1 mL,用 0.9% 无菌氯化钠溶液 10 倍稀释至 $10^{-5} \sim 10^{-7}$,约为 50~100 cfu/mL,做活菌计数备用。取经 25℃ 培养 24~48 小时的白色念珠菌改良马丁液体培养物 1 mL,用 0.9% 无菌氯化钠

溶液 10 倍稀释至 $10^{-5} \sim 10^{-6}$,约为 50~100 cfu/mL,做活菌计数备用。取经 25℃ 培养 1 周的黑曲霉改良马丁斜面培养物,加 5 mL 0.9% 无菌氯化钠溶液洗下黑曲霉孢子,吸取出孢子悬液 1 mL,加 0.9% 无菌氯化钠溶液适量稀释,用标准比浊管比浊,其浊度与标准比浊管相当后,取 1 mL 稀释后的孢子悬液,用 0.9% 无菌氯化钠溶液 10 倍稀释至 10^{-4} ,约为 50~100 cfu/mL,做活菌计数备用。

2.2 供试液制备 取供试品 10 g,置锥形瓶中,加 pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液 100 mL,振摇混匀,作为 1:10 供试液,取 1:10 供试液 10 mL,加 pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液 90 mL,振摇混匀,作为 1:100 供试液。

2.3 细菌检查法的验证 (1) 试验组:取 1:100 供试液 0.5 mL 注入平皿,同时加入 50~100 cfu 试验菌,立即倾注营养琼脂培养基,置 30~35℃ 培养箱培养 24~72 小时逐日观察结果。

(2) 菌液组:测定每一菌株所加的试验菌数。

(3) 供试品对照组:取 1:100 供试液 0.5 mL 注入平皿,立即倾注营养琼脂,置 30~35℃ 培养箱培养 24~72 小时逐日观察结果,测定供试品本底菌数。

(4) 回收率的计算:

按如下公式计算试验组的加菌回收率:

试验组的加菌回收率 =

$$\frac{\text{试验组的平均菌落数} - \text{供试品对照组的平均菌落数}}{\text{菌液组的平均菌落数}} \times 100\%$$

为该株阳性菌的回收率。结果见表 1。

2.4 霉菌、酵母菌检查法的验证 (1) 试验组:取 1:10 供试液 0.5 mL 和 50~100 cfu 试验菌同时加入平皿中,立即倾注玫瑰红钠琼脂培养基,待凝固后,置 23~28℃ 培养箱培养 24~72 小时,逐日观察结果。

(2) 菌液组:测定每一菌株所加的试验菌数。

(3) 供试品对照组:取 1:10 供试液 0.5 mL 加

入平皿中,立即倾注玫瑰红钠琼脂培养基,待凝固后,置规定温度培养 24~72 小时逐日观察结果,测定供试品本底菌数。

(4)回收率的计算:按前述公式计算试验组的加菌回收率,结果见表 1。

2.5 控制菌检查方法的验证

2.5.1 大肠埃希菌的检查 供试液的制备同“2.2”项下 1:10 供试液的制备。

试验组:取供试液 10 mL 加入 100 mL 胆盐乳糖培养基中,同时加入上述大肠埃希菌液 10~100 cfu,置 35℃ 培养 24 小时,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 小时、24 小时在 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,沿管壁加入数滴靛基质试液,观察。同时取胆盐乳糖培养基的培养物划线接种于曙红亚甲蓝琼脂培养基,培养 18~24 小时,观察结果。

阴性菌对照组:取供试液 10 mL 加入 100 mL 胆

表 1 细菌、霉菌和酵母菌计数方法学验证的试验结果(3 次)

试验序号	回收率%				
	金黄色葡萄球菌	枯草芽孢杆菌	大肠埃希菌	白色念珠菌	黑曲霉
1	103	87	86	84	86
2	84	77	84	92	91
3	79	96	80	78	82

表 2 控制菌检查方法学验证试验结果

大肠埃希菌检查	试验组 (供试液 + 大肠埃希菌)	阴性菌对照组 (供试液 + 金黄色葡萄球菌)
BL 培养基	+	-
MUG 靛基质试验	++	/
EMB 平板	典型菌落生长	无菌落生长
加入菌数(cfu)	82,74	78,71
大肠菌群检查	试验组 (供试液 + 大肠埃希菌)	阴性菌对照组 (供试液 + 金黄色葡萄球菌)
BL 乳糖发酵管	+	-
EMB 平板	典型菌落生长	无菌落生长

3 讨论

复方丹参片处方中的丹参具有较强的抑菌性,其所含的总丹参酮以及隐丹参酮、二氢丹参酮 I、羟基丹参酮 II A、丹参酸甲酯和丹参酮 II B,对敏感以及耐药的金黄色葡萄球菌均有较强的抗菌作用。另外,丹参的水浸剂在试管内对一些皮肤真菌也有不同程度的抑制作用。

鉴于处方中的丹参有较强抑菌性,但又不能确定其对微生物限度检查有多大影响,故采用依次渐进的方法来摸索合适的供试液浓度和方法。根据对 5 味药的抑菌成分的分析,选择了金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌和白色念珠菌三株较敏感菌株先进行试验,每 1 mL 1:10 供试液倾注 1 个平皿时,金黄色

盐乳糖培养基,同时加入上述金黄色葡萄球菌 10~100 cfu,置 35℃ 培养箱培养 24 小时,以下步骤同试验组,结果见表 2。

2.5.2 大肠菌群的检查 供试液的制备同“2.2”项下 1:10 供试液的制备。

试验组:取上述供试液 1 mL 加入含 10 mL 胆盐乳糖发酵培养基管 1 支,同时加入上述大肠埃希菌液 10~100 cfu,置 35℃ 培养箱中培养 18~24 小时,观察结果,将培养物接种于曙红亚甲蓝琼脂培养基的平板上,培养 18~24 小时,观察结果,结果见表 2。

阴性菌对照组:取上述供试液 1 mL 加入含 10 mL 胆盐乳糖发酵培养基管 1 支,同时加入上述金黄色葡萄球菌液 10~100 cfu,置 35℃ 培养箱培养 18~24 小时,观察结果,将培养物接种于曙红亚甲蓝琼脂培养基的平板上,培养 18~24 小时,

观察结果,结果见表 2。

葡萄球菌、枯草芽孢杆菌回收率均为 0,白色念珠菌回收率为 57%;每 1 mL 1:10 供试液倾注 2 个平皿时,金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌回收率均为 0,白色念珠菌和黑曲霉回收率在三次独立的平行试验中均能达到 70% 以上。每 1 mL 1:10 供试液等量倾注 5 个平皿,金黄色葡萄球菌回收率为 37%,枯草芽孢杆菌回收率为 26%,每 1 mL 1:100 供试液倾注 1 个平皿,金黄色葡萄球菌回收率为 55%,枯草芽孢杆菌回收率为 49%,每 1 mL 1:100 供试液倾注 2 个平皿时在三次独立的平行试验中金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、大肠埃希菌回收率均达到 70% 以上。

对于口服固体中药,该品种显示了较强的抑菌性。在对中药品种进行微生物限度检查方法学研究时,根据处方查阅文献选取恰当的敏感菌株进行预试验,往往能起到事半功倍的效果,而对结果进行分析与文献报道进行比较,更能增加该方法的可靠性。

参考文献

[1] 国家药典委员会. 中国药典(一部)[S]. 2005. I. Appendix(附录)70.

(收稿日期:2009-02-09 责任编辑:曹征)