牛黄上清胶囊微生物限度检查方法的验证

张文婷, 刘绪平

(江西省食品药品检验所, 南昌 330029)

摘要 目的: 建立牛黄上清胶囊的微生物限度检查法, 并对方法进行验证。方法: 细菌计数法为培养基稀释法; 霉菌、酵母菌计数法为培养基稀释法; 大肠埃希菌检查和大肠菌群检查均为常规法。结果: 在 3 次独立的平行试验中, 5 株试验菌回收率均大于 70%, 符合验证要求。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: 牛黄上清胶囊; 微生物限度检查; 方法验证

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2009)11-1961-03

Verification of methodology on the microbial limit test for Niu Huang Shang Qing capsules

ZHANG Wen-ting LU Xu-ping

(Jiangxi Provincial Institute for Food and Drug Control Nanchang 330029, China)

Abstract Objective To provide a method of the microbial limit test for Niu Huang Shang Qing capsules and carry out the verification of the method. **Method** Culture dilution method was used in bacterium count. Culture dilution method was also used in total combined molds and yeasts count while normal method was used in test for *Escherichia coli* and coliform. **Result** in the parallel experiment of 3 independence, 5 strains a germ recovery rate all more than 70%. **Conclusion** It can eliminate the antimicrobial properties and it can be used for the microbial limit test for Niu Huang Shang Qing capsules.

Key words Niu Huang Shang Qing capsules; microbial limit test; validation of the method

牛黄上清胶囊为 2005 年版中国药典一部品种, 功能与主治为清热泻火、散风止痛, 由 19 位中药组成, 而其中连翘、大黄、黄芩、黄连、黄柏这 5 味中药均具有较强的抑菌性, 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~50SII 高压蒸汽灭菌器 (上海博讯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], 均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, 均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 h 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 $50 \sim 100 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$, 做活菌计数备用。取经 25°C 培养 24~48 h 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 $50 \sim 100 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$, 做活菌计数备用。取经 25°C 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 $50 \sim 100 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$, 做活菌计数备用。

2.2 供试液制备 取供试品 10g 置锥形瓶中, 加 pH7.0 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 pH7.0 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°C 培养箱培养 24~72 h 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°C 培养箱培养 24~72 h 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:

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

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 0.2 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°C 培养箱培养 24~72 h 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 0.2 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 h 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°C 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 h, 观察结果。

阴性菌对照组: 取供试液 10 mL 加入 100 mL 胆盐乳糖培养基, 同时加入上述金黄色葡萄球菌 10~100 cfu, 置 35°C 培养箱培养 24 h, 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°C 培养箱中培养 18~24 h 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 h 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°C 培养箱培养 18~24 h 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 h, 观察结果, 结果见表 2。

表 1 细菌、霉菌和酵母菌计数方法学验证的试验结果

试验序号 (test no)	回收率 (recovery)%				
	金黄色 葡萄球菌 (<i>S. aureus</i>)	枯草芽 孢杆菌 (<i>B. subtilis</i>)	大肠 埃希菌 (<i>E. coli</i>)	白色 念珠菌 (<i>C. albicans</i>)	黑曲霉 (<i>A. niger</i>)
1	86	86	86	88	80
2	80	84	87	87	89
3	88	80	99	96	78

表 2 大肠埃希菌和大肠菌群检查方法学验证试验结果

大肠埃希菌检查 (test for <i>E. coli</i>)	试验组 (test group)	阴性菌对照组 (negative control group)
BL 培养基 (BL)	+	-
MUG 靛基质试验 (MUG indole test)	++	-
EMB 琼脂平板 (EMB agar medium)	典型菌落生长 (typical growth promoting)	无菌落生长 (no growth promoting)

续表 2

大肠埃希菌检查 (test for E. coli)	试验组 (test group)	阴性菌对照组 (negative control group)
大肠菌群检查 (test for coliform)	试验组 (test group)	阴性菌对照组 (negative control group)
胆盐乳糖发酵管 BL fermentation tube	+	-
EMB 平板 (EMB agar medium)	典型菌落生长 (typical growth promoting)	无菌落生长 (no growth promoting)

3 讨论

3.1 牛黄上清胶囊处方中的连翘、大黄、黄芩、黄连、黄柏^[2]这 5 味中药均具有较强的抑菌性,连翘果实、茎、叶水浸剂或乙醇提取物中主含糖苷连翘酯苷和连翘酚等成分抗菌谱广,对革兰氏阳性、阴性菌均有很强的活性,如对金黄色葡萄球菌的体外最低抑菌浓度极强,连翘在体外对多种病原菌有显著的抑制作用,连翘酯甙 B 有强抗真菌作用。连翘果皮挥发油也有显著抗菌效果,并能抑制白念菌的生长。大黄对大多数革兰氏阳性菌和一些革兰氏阴性菌及真菌均有抑制作用,抑菌的主要成分为蒽醌类衍生物,其中芦荟大黄素、大黄素及大黄酸的作用最强。黄芩有较广的抗菌谱,体外试管试验黄芩对金黄色葡萄球菌敏感,对大肠杆菌较差。黄连具有广谱的抗菌作用,有效成分主要为小檗碱,体外抑菌实验证明:黄连或小檗碱对金黄色葡萄球菌及一些真菌(白色念珠菌等)均有明显的抑制作用,且抗革兰氏阳性菌的作用要比抗阴性菌强。黄柏、黄柏煎剂或醇浸剂体外对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、绿脓杆菌等均有广泛的抑制作用,抗菌成分有小檗碱、巴马汀、药根碱等季铵类生物碱。

3.2 鉴于处方中这 5 味中药有较强抑菌性,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 3 株较敏感菌株先进行试验,每 1 mL 1: 10 供试液等量倾注 1 个平皿或者 2 个平皿时,金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、白色念珠菌回收率均为 0; 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 50%,枯草芽孢杆菌回收率为 35%,白色念珠菌和黑曲霉回收率在 3 次独立的平行试验中均能达到 70% 以上。

由于采用 1: 10 供试液进行试验时,金黄色葡萄球菌和枯草芽孢杆菌回收率仍达不到 70%,故采用 1: 10 供试液进行试验,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 70%,枯草芽孢杆菌回收率为 40%,每 1 mL 1: 100 供试液等量倾注 2 个平皿时,在 3 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,符合验证要求。

3.3 对于口服固体中药,该品种显示了较强的抑菌性,5 味中药对金黄色葡萄球菌和枯草芽孢杆菌均有不同程度的抑制作用,连翘、黄连同时对真菌如白色念珠菌有一定抑制作用。而黄芩、黄连、黄柏对大肠埃希菌只有微弱的抑制作用,在控制菌检查中只要常规法就能检查。以上试验结果也印证了文献中的内容。在对具有复杂处方的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 ChP(中国药典). 2005. Vol I (一部): Appendix(附录) 70
- 2 XIAO Pei-Gen(肖培根). Modern Chinese Materia(新编中药志). Vol II (第二卷). Beijing(北京): Chemical Industry Press(化学工业出版社), 2002. 288, 74, 868, 898, 668

(本文于 2008 年 10 月 16 日收到)