

乳没活络散微生物限度检查方法适用性研究\*

陆定艳<sup>1,2</sup>, 杨 健<sup>1,2</sup>, 宋 菲<sup>1,2</sup>, 李勇军<sup>3</sup>, 王永林<sup>1</sup>, 王爱民<sup>3</sup>, 刘 亭<sup>1\*\*</sup>, 林昌虎<sup>1\*\*</sup>

(1. 贵州医科大学 贵州省药物制剂重点实验室, 贵州 贵阳 550004; 2. 贵州医科大学 药学院, 贵州 贵阳 550025; 3. 贵州医科大学 民族药与中药开发应用教育部工程研究中心, 贵州 贵阳 550004)

[摘 要] 目的: 建立乳没活络散微生物限度的检查方法。方法: 按《中国药典》2015 年版四部通则微生物限度检查方法, 采用平皿法对乳没活络散的金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、枯草芽孢杆菌、白色念珠菌、黑曲霉进行回收率测定, 常规检测方法对制剂控制菌进行试验。结果: 通过平皿法和常规检测方法, 乳没活络散试验菌种的回收率均达到 70% 以上, 且都可以检测出控制菌, 符合验证要求。结论: 平皿法和常规检测方法可以用于乳没活络散的微生物限度检查。

[关键词] 乳没活络散; 微生物限度; 方法适应性; 平皿法; 回收率

[中图分类号] R927.1 [文献标识码] A [文章编号] 1000-2707(2018)10-1174-04

DOI:10.19367/j.cnki.1000-2707.2018.10.011

Study on the Adaptability of Inspection Method for  
Microbial Limit of Rumohuoluo San

LU Dingyan<sup>1,2</sup>, YANG Jian<sup>1,2</sup>, SONG Fei<sup>1,2</sup>, LI Yongjun<sup>3</sup>, WANG Yonglin<sup>1</sup>,  
WANG Aiming<sup>3</sup>, LIU Ting<sup>1</sup>, LIN Changhu<sup>1</sup>

(1. Guizhou Provincial Key Laboratory of Pharmaceutics, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China;  
2. School of Pharmacy, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, Guizhou, China; 3. Engineering Research  
Center for the Development and Application of Ethnic Medicine and TCM (Ministry of Education),  
Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China)

[Abstract] Objective: To establish an inspection method for the microbial limit of Rumohuoluo San. Methods: The plate method was carried out to inspect the recovery rate for *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans* and *Aspergillus niger* of Rumohuoluo San and conventional method was also used to test the specified microorganisms for preparations in accordance with the inspection method for microbial limit of general principles of *Chinese Pharmacopoeia* (2015 edition). Results: Through the plate method and the conventional method, the recovery rate of Rumohuoluo San test strains was more than 70%, and the control bacteria could be detected, which was in conformity with verification requirements. Conclusion: The plate method and conventional methods can be used for the microbial limit test of Rumohuoluo San.

[Key words] Rumohuoluo san; microbial limit; adaptability; plate method; recovery rate

乳没活络散来源于贵州省土家族民族处方, 是由三七、乳香、没药和地鳖虫等 10 味中药组成的散剂, 具有促进血液循环、舒经活络、消肿止痛的功效, 民间用于骨折、扭伤等疾病治疗已有 230 多年

历史, 疗效确切。贵州省思南田氏民族传统骨伤医院已将该验方开发成了医疗机构制剂 (批准文号: 黔药制字 Z20170134)。由于乳没活络散是含药材原粉的外用中药制剂, 使用中会与创面直接接触,

\*[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (81760699); 贵州省创新人才团队项目 [黔科合平台人才 (2016) 5613]; 贵州省创新人才团队项目 [黔科合平台人才 (2016) 5677]  
\*\* 通信作者 E-mail: t-liu@163.com; linchanghu79@sina.com  
网络出版时间: 2018-10-10 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/52.1164.R.20181010.2224.022.html>  
1174

所以微生物限度检查是其质量要求的重要检查项目,其使用的安全性也与微生物污染程度息息相关<sup>[1]</sup>。为了有效控制乳没活络散的质量,本研究按照《中国药典》2015 年版四部微生物限度检查法的相关要求<sup>[2]</sup>,设计了乳没活络散辐照工艺前后的微生物限度检查法,为考察辐照工艺的可行性提供实验支撑,保证制剂安全有效。

## 1 材料与方法

### 1.1 一般材料

**1.1.1 仪器与样品** 超净工作台(SW-CJ-2FD,苏州苏洁净化设备有限公司),高压蒸汽灭菌器(YXQ-LS-50S II,上海博迅实业有限公司医疗设备厂)。乳没活络散(批号 20160405、20160409 及 20160413 下文中分别简称为 05、09 及 13),由思南田氏民族传统骨伤医院提供。

**1.1.2 培养基及稀释剂** pH 7.0 氯化钠-蛋白胨缓冲液(批号 160622),沙氏葡萄糖琼脂培养基(批号 1611252),溴化十六烷基三甲胺琼脂培养基(批号 160309),甘露醇氯化钠琼脂培养基(批号 161209),胰酪大豆胨液体培养基(批号 1611212),胰酪大豆胨琼脂培养基(批号 1611042),均购自北京三药科技开发公司,且均通过培养基适用性检查。

**1.1.3 菌株** 金黄色葡萄球菌[CMCC(B)26003](*Staphylococcus aureus*)菌珠、铜绿假单胞菌[CMCC(B)10104](*Pseudomonas aeruginosa*)菌珠、枯草芽孢杆菌[CMCC(B)63501](*Bacillus subtilis*)菌珠、白色念珠菌[CMCC(F)98 001](*Candida albicans*)菌珠、黑曲霉[CMCC(F)98 003](*Aspergillus niger*)菌珠均购自北京三药科技开发公司,均为第 4 代菌种,10<sup>6</sup> cfu/颗。

### 1.2 方法

按照 2015 年版《中国药典》四部通则 1105“非无菌产品微生物限度检查中的微生物计数法”对样品进行微生物计数,根据通则 1106“非无菌产品微生物限度检查中的控制菌检查法”对样品进行控制菌检查。

**1.2.1 菌液制备** 将 pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液 1 mL 加入装有菌珠(106 cfu/颗)的西林瓶中,盖上瓶盖,静置约 30 s,涡旋震荡 5~10 s。吸取完全溶解的菌液 1 mL,加入 pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液 9 mL 中,混匀;再从该稀释液中吸取菌液 1 mL,加入 pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液 9 mL,最终配制成 10<sup>7</sup> cfu/L 的菌液。

**1.2.2 供试液制备** 取 10 g 试样加入 pH7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液至 100 mL、混合均匀,制成均匀的 1:10 测试溶液。辐照灭菌前的供试品:取 10 g 辐照灭菌前的试样加入 pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液至 100 mL、摇匀,制成均匀的 1:10 供试液;吸取 1:10 供试液 10 mL 加入 pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液至 100 mL、混匀,制成均匀的 1:100 的供试液,备用。辐照灭菌后的供试品:取 10 g 辐照灭菌后的试样加入 pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液至 100 mL、摇匀,制成均匀的 1:10 的供试液,备用。

**1.2.3 计数方法适用性试验** 按《中国药典》2015 年版四部中“供试品计数方法适用性试验”项下平皿倾注法进行实验。胰酪大豆胨琼脂培养基用于需氧菌总数测定(金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、枯草芽孢杆菌),沙氏葡萄糖琼脂培养基用于霉菌及酵母菌总数测定(白色念珠菌、黑曲霉)。每株实验菌每种培养基均制备 2 个平皿,计算平均数。用 pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液作为稀释液,试验组取 1:10、1:100 供试液 9.9 mL,加入 100  $\mu$ L 制备好的试验菌液(10<sup>7</sup> cfu/L),每 1 mL 供试液中的含菌量不大于 100 cfu,从管中吸取 1 mL 注入细菌培养皿中,倾倒对应的培养基,轻晃平皿使均匀。供试品对照组分别取 1:10、1:100 供试液,以稀释液代替菌液,操作同试验组。菌液对照组取稀释液 9.9 mL,按试验组操作加入试验菌液并进行微生物回收试验。胰酪大豆胨琼脂培养基皿置于 32  $^{\circ}$ C 恒温培养箱倒置培养 72 h,沙氏葡萄糖琼脂培养基皿置于 22  $^{\circ}$ C 恒温培养箱倒置培养 120 h,统计菌落数,计算回收率。菌落回收率(%)=(实验组平均菌落数-供试品对照组平均菌落数)/菌液对照组平均菌落数 $\times$ 100%<sup>[3-4]</sup>。

**1.2.4 控制菌检查方法适用性试验** 按 2015 年版《中国药典》四部通则 1106“非无菌产品微生物限度检查中的控制菌检查法”项进行试验。(1)金黄色葡萄球菌:阳性对照组取 1:10 供试液 10 mL,金黄色葡萄球菌菌液(10<sup>7</sup> cfu/L)100  $\mu$ L,转入装有 100 mL 胰酪大豆胨液体培养基的三角瓶中,32  $^{\circ}$ C 培养 20 h;另取 pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液 10.1 mL 转入装有 100 mL 胰酪大豆胨液体培养基的三角瓶中,32  $^{\circ}$ C 培养 20 h,作为阴性对照组;取出培养物,用划线法将培养物接种于甘露醇氯化钠琼脂培养基平板上,32  $^{\circ}$ C 培养 72 h<sup>[5]</sup>,观察是否有黄色菌落或外周有黄色环的白色菌落,若有则取

上述菌落进行血浆凝固酶试验。如果平板上没有菌落生长,或有菌落生长但血浆凝固酶实验为阴性,则判断供试品未检出金黄色葡萄球菌<sup>[2]</sup>。(2)铜绿假单胞杆菌:依 1.2.4 中(1)项下方法制备铜绿假单胞杆菌的阳性对照组和阴性对照组,取出培养物,用划线法将培养物接种于溴化十六烷基三甲铵琼脂培养基平板上,32 ℃ 培养 72 h<sup>[6]</sup>,观察是否有菌落生长,若有则取上述菌落进行氧化酶实验;如果平板上没有菌落生长,或有菌落生长但氧化酶实验为阴性,则判供试品未检出铜绿假单胞杆菌<sup>[2]</sup>。

2 结果

2.1 乳没活络散微生物计数

辐照前和辐照后的供试品用平皿法进行微生

物计数时,辐照前的供试品在白色念珠菌及霉菌总数测定上,1:10 供试品的试验组菌落回收率在 70% 以上,方法适用性达到要求;但在该稀释度下,需氧菌总数过多,超过 300 cfu/皿,不适宜用于计数,还需要后续考察其稀释级。而辐照后 1:10 供试品的试验组菌落回收率在 70% 以上,方法适用性达到要求,故辐照后供试品采用 1:10 的稀释级来进行后续微生物计数试验。因辐照前供试品 1:10 不满足适应性要求,故采用 1:100 稀释级进行回收率考察,结果显示,1:100 稀释级的辐照前供试品的试验组菌落回收率在 70% 以上,且平均菌落数都小于 300 cfu/皿,故辐照前供试品采用 1:100 的稀释级来进行后续微生物计数试验。辐照前后供试品菌落回收率见表 1 和表 2。

表 1 辐照前后不同批次 1:10 供试品菌落回收率

Tab. 1 Recovery of samples of different batches before and after irradiation

项目	金黄色葡萄球菌			铜绿假单胞菌			枯草芽孢杆菌			白色念珠菌			黑曲霉		
	05	09	13	05	09	13	05	09	13	05	09	13	05	09	13
辐照前															
试验组 (cfu)	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	94	89	91	89	92	97
供试品对照组 (cfu)	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	50	51	50	49	50	53
菌液对照组 (cfu)	51	54	58	65	59	72	46	51	42	48	42	39	43	47	52
试验组菌回收率 (%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	92	90	105	93	89	85
辐照后															
试验组 (cfu)	41	47	48	54	47	55	34	31	34	36	43	40	42	45	37
供试品对照组 (cfu)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
菌液对照组 (cfu)	47	57	53	61	57	66	39	36	41	41	55	47	48	56	44
试验组菌回收率 (%)	87	82	91	89	82	83	87	86	83	88	78	85	88	80	84

注:“-”菌落数 >300,不适宜用于计数

表 2 辐照前不同批次 1:100 供试品菌落回收率

Tab. 2 Recovery of samples before irradiation

菌种	批次	试验组 (cfu)	供试品 对照组 (cfu)	菌液对 照组 (cfu)	试验组 菌回收 率 (%)
金黄色葡萄球菌	20160405	97	57	47	85
	20160409	88	52	45	80
	20160413	89	47	47	89
铜绿假单胞菌	20160405	96	53	57	75
	20160409	93	48	55	82
	20160413	107	59	55	87
枯草芽孢杆菌	20160405	98	61	39	95
	20160409	108	69	44	89
	20160413	103	65	46	83
白色念珠菌	20160405	46	3	41	105
	20160409	51	4	43	109
	20160413	47	2	47	96
黑曲霉	20160405	49	5	48	92
	20160409	45	7	41	93
	20160413	47	4	39	110

2.2 乳没活络散控制菌检查方法适用性试验

结果表明,常规检测方法适合于乳没活络散的控制菌金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌的检查。见表 3。

3 讨论

乳没活络散为医院制剂,临床应用疗效确切,在民间得到广泛的应用,所以对于乳没活络散的质量控制显得尤为重要,其中微生物的限度检查就是控制和提高制剂质量、确保患者用药安全的重要环节<sup>[7-9]</sup>。由于中药成分较为复杂,其中的任何成分都有可能影响微生物限度检查的准确性,在微生物限度检查前首先要排除自身抑菌作用以防止其对实验结果的干扰,从而使测出的结果更加可靠<sup>[10]</sup>。微生物限量检查中微生物回收的方法有平皿法、薄膜过滤法和 MPN 法,其中平皿法最为常用,且该法常用于无抑菌作用及抑菌作用较弱的药物,当药物

表 3 乳没活络散中金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌检查结果

Tab.3 Results of the test of <i>Staphylococcus aureus</i> and <i>Pseudomonas aeruginosa</i> in rumohuoluo san							
项目	批号	金黄色葡萄球菌			铜绿假单胞菌		
		甘露醇氯 化钠琼脂	血浆凝固酶 试验	检出 情况	溴化十六烷基 三甲铵琼脂	氧化酶试验	检出 情况
阳性对照组－辐照前	20160405	典型菌落生长	+	检出	典型菌落生长	+	检出
	20160409	典型菌落生长	+	检出	典型菌落生长	+	检出
	20160413	典型菌落生长	+	检出	典型菌落生长	+	检出
阳性对照组－辐照后	20160405	典型菌落生长	+	检出	典型菌落生长	+	检出
	20160409	典型菌落生长	+	检出	典型菌落生长	+	检出
	20160413	典型菌落生长	+	检出	典型菌落生长	+	检出
阴性对照组		无菌落生长	－	未检出	无菌落生长	－	未检出

注：+ 表示阳性反应，－ 表示阴性反应

的抑菌作用较强时,应消除药物的抑菌作用对微生物限度检查的干扰,采用薄膜过滤法或其他方法<sup>[11-13]</sup>。

在本研究中,采用平皿法对乳没活络散的微生物限度进行方法适应性的检验,实验结果表明,辐照前的供试液比例为 1: 10 时,样品浓度过高,实验组及供试品对照组需氧菌的菌落数均 > 300,不宜进行计数。故将供试品稀释成 1: 100 进行试验。微生物限度实验结果显示 3 个批次的乳没活络散在辐照前后对 5 种实验菌株的回收率均在 70% 以上,表明乳没活络散对实验的 5 种菌种均无抑制作用<sup>[14-16]</sup>,说明平皿法适用于乳没活络散的微生物限度的检查。在控制菌检查中,采用常规检测方法能检测出阳性对照组的金黄色葡萄球菌及铜绿假单胞菌,故乳没活络散的控制菌检查亦可选用常规检测方法。同时,本研究比较辐照前后的结果差异,发现辐照前样品的金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、枯草芽孢杆菌及控制菌检查均不满足要求,而对样品进行辐照处理后,微生物限度检查项目均满足要求,这说明了我们的辐照工艺的合理性。

综上所述,通过方法验证试验,乳没活络散的工艺处理可通过辐照处理,而且辐照后样品的微生物限度检查可采用平皿法对需氧菌、霉菌及酵母菌进行计数,控制菌检查采用常规检测方法即可达到效果。

4 参考文献

[1] 杨静,詹才智,柴建辉. 2 种医院制剂微生物限度检查方法的建立[J]. 医药导报, 2017, (36): 79-80.

[2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典药典[M]. 北京:中国医药科技出版社, 2015:140-149.

[3] 郭红玲,邓曼静. 2 种外用医院制剂微生物限度检查方

法学的验证与建立[J]. 湖南中医杂志, 2017, 33(12): 144-146.

[4] 刘康连,庞云娟,周晓婷. 5 种同名异型中药制剂微生物限度检查法的建立与结果分析[J]. 中成药, 2017, 39(7):1515-1518.

[5] 李俨,姜丽. 呋喃西林片 2015 年版微生物限度检查标准及探索性研究[J]. 中国卫生标准管理, 2016, 7(15):121-123.

[6] 简晓莉,刘志承,李曙光,等. 疮疡散微生物限度检查方法的适用性试验研究[J]. 中国药业, 2018, 27(16):20-22.

[7] 荆晓红,李红卫,姜娟,等. 医院自制制剂微生物限度检查的影响因素研究[J]. 药物化学, 2017, 5(4):61-63.

[8] 杨静,李晓翠,徐轶飞. 四种医院制剂微生物限度检查法验证试验[J]. 中国医药科学, 2015, (19):51-53.

[9] 王振坚,尹松鹤. 药品微生物检验的方法与应用[J]. 生物技术世界, 2015, (6):269-269.

[10] 卫延明,韩金龙,吕倩,等. 中成药木香顺气丸微生物限度检查方法的验证研究[J]. 临床医学, 2016, 29(16):63-64.

[11] 李东娴,杜春华,牛延菲,等. 大黄饮片微生物限度检查方法适用性研究[J]. 中国民族民间医药, 2017, 26(7):46-48.

[12] 汪琦,李雄英,吴智娟,等. 肤宁洗剂微生物限度检查方法的建立及验证[J]. 浙江中西医结合杂志, 2017, 27(8):713-716.

[13] 闹闹尔再,杜尔再. 罗布麻浸膏微生物限度检查方法的验证[J]. 中国民族民间医药, 2015, (8):35-35.

[14] 张丽梅,李俊,宋畅. 三种中药制剂微生物限度检查方法学验证[J]. 解放军药学报, 2015, (1):90-92.

[15] 闹闹尔再. 八种蒙药制剂微生物限度检查方法验证[J]. 亚太传统医药, 2015, 11(12):14-16.

[16] 刘广文,苑艳飞. 养肝解毒丸微生物限度检查法的验证实验[J]. 中国医药科学, 2016, 6(13):54-57.

(2018-07-05 收稿,2018-09-16 修回)  
中文编辑: 刘 平; 英文编辑: 丁廷森