

归红祛风酒微生物限度检查的方法学验证研究

谢 芳,刘渊漪,黎向阳

[摘要] **目的:**建立归红祛风酒的微生物限度检查方法。**方法:**利用薄膜过滤消除归红祛风酒中的絮状沉淀。分别采用培养基稀释法、薄膜过滤法对样品进行微生物限度检查;根据6株阳性对照菌的实验组、菌液组、供试品对照组的结果进行方法学验证。**结果:**大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、白色念珠菌和黑曲霉的菌落回收率均>70%;通过控制菌检查,阳性实验菌均能检出。**结论:**薄膜过滤法能够适应菌落计数,归红祛风酒按照供试液制备法和控制菌检查法均能检出实验菌。

[关键词] 微生物检查;薄膜过滤法;归红祛风酒

[中图分类号] R 446.5 **[文献标志码]** A **DOI:**10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2015.03.032

Validation of the microbial limit inspection method of guihongqufeng wine

XIE Fang, LIU Yuan-yi, LI Xiang-yang

(Department of Pharmacy, The Traditional Chinese and Western Medicine Guanghua Hospital of Shanghai, Shanghai 200052, China)

[Abstract] **Objective:** To establish the method of the microbial limit inspection of guihongqufeng wine. **Methods:** The flocculent precipitation of preparation was removed by membrane-filter procedure. The microbial limit of sample was inspected by culture medium dilution and membrane-filter procedure. The methodology was validated by the results of 6 positive bacteria experimental group, microbial group and control group. **Results:** The recoverys of bacterial colony in *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans* and *Aspergillus niger* were more than 70%. All positive bacteria could be detected by the control germ test. **Conclusions:** The membrane-filter procedure can count the bacterial colony, the test organisms can be checked out by the methods of liquid preparation and control germ test.

[Key words] microbial test; membrane-filter procedure; guihongqufeng wine

归红祛风酒具有祛风除湿、舒筋活络作用^[1],用于类风湿性关节炎所致筋骨疼痛、四肢麻木等^[2]。制剂中微生物污染状况的控制是药品质量控制的重要方面,当药品本身具有抗干扰作用时,应首先消除其干扰作用,以保证检验结果的有效性。我们按照2010年版《中国药典》(一部)中微生物限度检查方法学验证的规定^[3]和药品检验标准操作规范^[4],对归红祛风酒的微生物限度检查方法进行了方法学验证实验,现作报道。

1 材料与方 法

1.1 材 料 归红祛风酒,每瓶500 ml(批号110308),上海市光华中西医结合医院产。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]、沙门菌[CMCC(B)50094]、白色念珠菌[CMCC(F)98001]、黑曲霉[CMCC(F)98003]由上海闸北食品药品检验所提供。营养琼脂培养基(批号100528)、营养肉汤培养基(批号100414)、玫瑰红钠琼脂培养

基(批号100520)、胆盐乳糖培养基(批号100601)、改良马丁琼脂培养基(批号100201)、MUG培养基(批号100201)、pH7.0氯化钠-蛋白冻缓冲液(批号100517)、四硫磺酸钠亮绿培养基(批号100315)、胆盐硫乳琼脂培养基(批号100425)、麦康凯琼脂培养基(批号100714)、三糖铁琼脂培养基(批号100421)均由上海市中科昆虫生物技术开发有限公司提供。

1.2 仪 器 立式压力蒸汽灭菌器(上海博讯实业有限公司医疗设备厂),100级超净工作台(北京四达净化技术研究所),电热恒温培养箱(浙江嘉兴新腾电器厂),生化培养箱(上海博讯实业有限公司医疗设备厂),电动吸引器(上海祁鑫医疗器械厂)。

1.3 菌液制备 接种大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌的新鲜培养物至营养琼脂培养基上,置30~35℃培养10~24 h,分别取上述培养物用0.9%氯化钠注射液稀释成每毫升含菌数50~100 cfu的菌悬液。接种白色念珠菌的新鲜培养物至改良马丁琼脂培养基上,置23~28℃培养24~48 h,取上述培养物用0.9%氯化钠注射液稀释成每毫升含菌数50~100 cfu的菌悬液。接种黑曲霉的新鲜培养物至改良马丁琼脂斜面培养基上,置23~28℃培养5~7 d,加入3~5 ml含0.05%聚山梨酯

[收稿日期] 2013-01-16

[作者单位] 上海市长宁区光华中西医结合医院 药剂科,200052

[作者简介] 谢 芳(1967-),女,主管药师。

80 的 0.9% 氯化钠注射液,将孢子洗脱。吸出孢子菌悬液至无菌试管中,用含 0.05% 聚山梨酯 80 的 0.9% 氯化钠溶液制成每毫升含菌数 50~100 cfu 的孢子菌悬液。

1.4 供试液制备 因本品中含有絮状沉淀,故先用无菌滤纸(定量中速)过滤除去沉淀物,再取过滤液 10 ml 加 pH7.0 的无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液至 100 ml,混匀,作为供试液。

1.5 细菌、霉菌和酵母菌计数方法的验证 均重复进行 3 次独立平行实验。

1.5.1 实验组 取供试液 10 ml,薄膜过滤,用稀释液 600 ml 分 6 次冲洗,在最后 1 次的冲洗液中分别加入大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、白色念珠菌、黑曲霉 5 种菌悬液 1 ml(含 50~100 cfu),每株菌平行制备 2 张滤膜,菌面朝上,分别贴于营养琼脂培养基和玫瑰红钠培养基的平板上,细菌置 30~35 ℃ 培养 3 d,霉菌、酵母菌置 23~28 ℃ 培养 5 d。

1.5.2 菌液组 分别取菌液各 1 ml(含 50~100 cfu)到无菌培养皿中,然后注入相应的培养基,混匀。细菌置 30~35 ℃ 培养 3 d,霉菌、酵母菌置 23~28 ℃ 培养 5 d。同时做 2 份。

1.5.3 供试品对照组 取供试液 10 ml,薄膜过滤,用稀释液 600 ml 分 6 次冲洗,平行制备 4 张滤膜,菌面朝上各 2 张分别贴于营养琼脂培养基和玫瑰红

钠琼脂培养基的平板上,分别置 30~35 ℃ 培养 3 d 和 23~28 ℃ 培养 5 d。测定供试品的本底菌数。

1.5.4 稀释剂对照组 把供试液换成稀释剂,方法同实验组,每株菌平行制备 2 张滤膜,菌面朝上分别贴于营养琼脂培养基和玫瑰红钠琼脂培养基的平板上,分别置 30~35 ℃ 培养 3d 和 23~28 ℃ 培养 5 d。

1.5.5 细菌、霉菌和酵母菌回收率测定

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

$$\text{稀释剂对照组回收率}(\%) = \frac{\text{稀释剂对照组平均菌落数}}{\text{菌液组的平均菌落数}} \times 100\%$$

1.6 控制菌检查方法的验证 大肠埃希菌及沙门菌两种细菌验证方法相同,合并(1)菌液制备:接种上述菌的新鲜培养物至营养肉汤培养基中,30~35 ℃ 培养 18~24 h,用 0.9% 氯化钠注射液稀释成每毫升含 10~100 cfu 的菌悬液。分别测定加入的各个实验菌菌液中每毫升的菌数。(2)验证:取实验菌菌液 1 ml(即 10~100 cfu 试验菌)及经无菌脱脂棉过滤后配置的规定量供试液,按《中国药典》2010 年版(一部)附录 XIII C 薄膜过滤法进行检查。

2 结果

2.1 菌种回收率 5 株实验菌的实验组菌回收率和稀释剂对照组菌的回收率均大于 70%(见表 1)。

表 1 菌种回收率比较

菌种类型	试验次数	试验组/cfu	菌液组/cfu	供试品对照组/cfu	稀释剂对照组/cfu	试验组菌回收率/%	稀释剂对照组菌回收率/%
大肠埃希菌	1	67	89	0	79	75.3	88.8
	2	72	93	0	85	77.4	91.4
	3	75	93	0	96	80.6	103.2
金黄色葡萄球菌	1	81	96	0	87	84.4	90.6
	2	74	88	0	81	84.1	92.0
	3	69	81	0	83	85.2	102.5
枯草芽孢杆菌	1	69	83	0	77	83.1	92.8
	2	59	79	0	73	74.7	92.4
	3	59	76	0	79	77.6	103.9
白色念珠菌	1	48	61	0	55	78.7	90.2
	2	53	68	0	63	77.9	92.6
	3	58	68	0	61	85.3	89.7
黑曲霉	1	51	69	0	59	73.9	85.5
	2	49	63	0	57	77.8	90.5
	3	59	71	0	64	83.1	90.1

层次不同,本研究仅限 16~30 岁的新生代农民工;三是样本数不同,本研究的样本数更大。当然造成不同结论的原因还需要进一步的探讨证实。

[参 考 文 献]

- [1] 廖传景,毛华配,宫本宏. 城市农民工心理健康及群体差异调查研究——以浙江省温州市为例[J]. 生态经济,2010(5): 183-184.
- [2] 孙崇勇. 东北地区农民工心理健康状况的调查与分析[J]. 四川精神卫生,2007,20(1):17-19.
- [3] 胡荣华,葛明贵. 对 408 名城市农民工心理健康状况的调查[J]. 中国卫生事业管理,2008,25(3):196-198.
- [4] 章芳,李祚山,卢淋淋,等. 重庆市农民工心理健康状况的调查研究[J]. 中国卫生事业管理,2011,28(11):864-867.
- [5] 贾凤芹,吴燕. 苏州市青年农民工心理健康状况与影响因素研究[J]. 中国民康医学,2008,20(23):2823-2826.
- [6] 韩雪松. 新生代农民工的心理困境与解决策略[J]. 西安社会科学,2009,27(4):121-123.
- [7] 张居永. 新生代农民工生存状况与心理状况的调查与思考

[J]. 岭南学刊,2012(1):103-107.

- [8] 胡宏伟,王金鹏,曹杨. 新生代农民工心理问题与求助行为研究[J]. 西北人口,2011,32(5):27-33.
- [9] 张复俊. 安徽省新生代农民工社会心理问题调查报告[J]. 理论建设,2012(2):10-13.
- [10] 金华,吴文源,张明园. 中国正常人 SCL-90 评定结果的初步分析[J]. 中国神经精神疾病杂志,1986,12(5):260-263.
- [11] 张慧琴. 河南省农村外出务工人员心理健康状况调查与分析[J]. 西北人口,2009,30(3):76-79.
- [12] 闫凤武. 齐齐哈尔市新生代农民工心理健康状况调查[J]. 中国健康心理学杂志,2011,19(8):937-939.
- [13] 黄小妹,张泉水,夏莉,等. 深圳市 1 390 名新生代农民工的心理压力调查[J]. 当代医学,2012,18(9):151-152.
- [14] 蒋善,张璐,王卫红. 重庆市农民工心理健康状况调查[J]. 心理科学,2007,30(1):216-218.
- [15] 刘衍华. 春节返乡农民工心理健康调查[J]. 现代预防医学,2006,33(10):1926-1927.

(本文编辑 刘梦楠)

(上接第 387 页)

2.2 控制菌检出情况 按上述供试液制备法和控制菌检查法,控制菌均能检出(见表 2)。

表 2 控制菌检出情况

肉汤增菌	MUG-Indole	TTB	胆盐硫乳	三糖	生化
			和 Macc 平板	铁琼脂斜面	试验
大肠埃希菌	浊	+	-	-	=
沙门菌	浊	-	+	+	+

3 讨论

归红祛风酒是我院的自制制剂。此乃我院蛇系列制剂之一,以截风之药蛇为君,浸泡酒液中参以生地、当归、红花补血逐痹,活血通络。佐以防风、防己、木瓜祛风舒筋,土茯苓除湿利关节,在治风湿之良药威灵仙的聚合之下祛风湿,通经络更是相当益彰,由 52°白酒引导诸药,宜通经脉而达到镇痛消炎之作用。该制剂属酒剂,乙醇含量为 30%~40%,本身有抑菌作用。且在储存期间允许有少量摇之易散的沉淀,故在检验时应排除这些因数,使之不干扰限度检查。归红祛风酒属酒剂,储存期间允许有少量摇之易散的沉淀,故在检验时应排除其沉淀,使之不干扰限度检查^[5]。我们用薄膜过滤法进行菌落

计数,3 次平行实验中大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、白色念珠菌和黑曲霉实验组的菌落及稀释剂对照组的菌落回收率均大于 70%,说明该方法适应于细菌、霉菌和酵母菌计数。有效地解决了药物沉淀的干扰问题。

因归红祛风酒是含动物组织的口服给药制剂,故 2010 版《中国药典》(一部)附录微生物限度标准中增加了对沙门菌的检查。

通过对归红祛风酒微生物限度检查方法的验证,确认该产品的微生物限度检查法中细菌、霉菌及酵母菌计数和控制菌检查均先经无菌脱脂棉过滤后再采用薄膜过滤法进行该产品的检查。

[参 考 文 献]

- [1] 黄甲明,付青梅,吴优,等. 乌蛇川乌酒治疗幼年型类风湿关节炎 1 例[J]. 人民军医,2011,54(5):356.
- [2] 蔡光光,廖亮黄,宁泽璞,等. 类风湿性关节炎[J]. 湖南中医杂志,2011,27(3):120-122.
- [3] 中国药典 2010 年版(一部)[M]. 北京:中国医药科技出版社,2010.
- [4] 苏德模,杜平华,马绪荣,等. 中国药品检验标准操作规范[M]. 北京:中国医药科技出版社,2005:325-347.
- [5] 陆惠文,阮桂平. 中国药品检验标准操作规范[M]. 北京:中国医药科技出版社,2005:470-471.

(本文编辑 姚仁斌)