

增效黄连素片微生物限度检查方法的研究

许卫(杭州 310013 杭州澳亚生物技术有限公司)

摘要 增效黄连素具有较强的抑菌作用,常规的方法无法进行微生物限度检查(菌检)。本文通过几种方法的比较及研究,总结出了自然沉降上清液结合稀释的方法,解决了增效黄连素片的菌检方法问题。实验证明,该方法实用可靠,简便易行。

关键词 增效黄连素;微生物限度检查;菌检;药品卫生学

增效黄连素片是由盐酸黄连素,与甲氧苄氨嘧啶组合而成的口服抗菌药物,按我国的卫生部 1989 年药品卫生标准规定,应进行菌检,即细菌、霉菌及大肠杆菌的限度检查。但在检验过程中发现,该品的抑菌作用较强,不能用常规方法进行菌检。卫生部药品卫生标准对此品种又未作特殊规定,为保证出厂产品能符合药品卫生标准,为此,对该品种的菌检方法进行了探索,本文选用了 5 种方法进行了比较研究。结果表明,自然沉降上清液结合稀释的方法适合于该产品的菌检。

1 实验材料

1.1 菌种

大肠埃希氏菌(44102);绿脓假单胞菌(10104);乙型副伤寒沙门氏菌(50094);金黄色葡萄球菌(26003);白色念珠菌(无菌号)。以上菌种均由中国药品生物制品检定所提供。

1.2 培养基

干燥肉汤培养基,干燥霉菌(液体)培养基,干燥肉汤琼脂培养基,干燥虎红琼脂培养基,干燥胆盐乳糖增菌液培养基(B.L),干燥伊红美兰琼脂培养基(EMB)。以上培养基均由余姚微生物培养基厂提供。

1.3 样品

增效黄连素片(杭州利民制药厂)。

1.4 仪器

YP-药品匀浆仪(浙江宁海白石药检仪器厂)。

2 实验方法 2.1 供试液的制备及试验菌的污染方法

无菌操作称取样品 10.0g,加无菌生理盐水 100ml,用 YP-1 药品匀浆仪第一档转速(3000r/min)处理 1min,即得 1:10 供试液。

除白色念珠菌用霉菌(液体)培养基(10ml/试管)在 25℃培养 72h 外,其余各试验菌均接种于肉汤培养基(10ml/试管)中,在 37℃培养 24h 进行活化。活化后的各试验转种相同的培养基中用相同条件培养,然后用 10 倍稀释法稀释成含不同菌数的稀释液,取 1ml 至

上述 1:10 供试液中,作染菌试验。大肠杆菌约 100 个直接加入胆盐乳糖增菌液中。

2.2 样品菌检方法的比较试验

根据文献资料,结合本试验样品实际,采用下述各法,对样品分别进行试验,比较实验结果。

2.2.1 常规法:按《药品卫生检验方法》中普通药品菌检方法进行试验。

2.2.2 稀释法:扩大上述供试液的稀释倍数进行试验。

2.2.3 离心法:取上述 1:10 供试液 10ml 于刻度离心管中 500r/min 离心 5min(第一级离心)后,用无菌吸管吸取上清液于另一无菌刻度离心管中用 3500r/min 离心 30min(第二级离心),弃除上清液,沉淀用与弃除之上清液相同的量的无菌生理盐水制成悬浮液。以此悬浮液作为供试液进行试验。

2.2.4 自然沉降上清液法:将上述 1:10 供试液在室温条件下静置至粉状悬浮物沉淀后,取上清液进行试验。

2.3 方法的修饰

对根据上述各种菌检方法的比较结果而选出的方法进行必要的补充与完善。

2.4 方法的实用性考核

取待测样品按经上述实验建立的方法进行实测。

3 结果与讨论

3.1 方法的比较试验结果

对其中 4 种方法的比较试验结果见表 1。

从表 1 可看出,①常规法 1:10 供试液平板计数无菌落生长,其后的稀释度平板菌落数既不成十倍梯度递减,回收率也极低。这说明:该药品含量高,抑菌作用较强,抑制了细菌的生长,且 1:10 稀释度平板中药品颜色浓,各试验菌色素产生不明显,故常规法不适于该品菌检。

②稀释法:进行超过 1:1000 的稀释,仍然不能除去或减低药品的抑制作用及使稀释度间平板菌落数计数呈现正常梯度比例,亦不能在有效的稀释范围内提高

表 1 4 种方法细菌计数平板结果的观察

方 法	1:10 供试液中加菌 (相当于样品个/g)	供试液稀释度	平板菌落		回收率(%)	药物颜色	菌落颜色	方法难易
			检出数(个)	推算数(个)				
常规法	8.9 × 10 ⁵	1:10	0	8.9 × 10 ⁴	0	浓	无	易
		1:100	43	8.9 × 10 ³	0.5	淡	无	
		1:1000	23	8.9 × 10 ²	2.5	淡	无	
		1:10000	19	8.9 × 10 ¹	21	淡	无	
稀释法	8.9 × 10 ⁵		约 400	1.8 × 10 ³	2.2	较浓	无	易
			147	1.8 × 10 ²	8.2	淡	无	
			26	1.8 × 10 ¹	15	淡	无	
			448	8.0 × 10 ⁴	0.6	淡	无	
离心法	8.0 × 10 ⁵		108	8.0 × 10 ³	1.4	无	正常	繁
			10	8.0 × 10 ²	1.3	无	正常	
			410	1.6 × 10 ³	26.3	较淡	无	
自然沉降	1.6 × 10 ⁴		60	1.6 × 10 ²	38.5	淡	正常	易
上清液法			6	1.6 × 10 ¹	38.5	无	正常	

细菌的回收率。实际应用中,该药品的细菌指标(≤ 1000 个/g)要求方法的灵敏度达到 1:1000 以内的稀释无实际意义。照 1:50 稀释度平板中药物颜色仍较浓,细菌菌落很小,菌落色素不明显。从表中还可推出,即使稀释至 1:10000 也不能达到正常生长。因此,稀释法也不适用该品菌检。

③离心法:二次离心,用具增加,操作繁琐,实际效果也不佳,主要是回收率低。这与供试样品品质有关。该品制成 1:10 供试液后,呈均匀的粉状悬液,第一级离心后,只能收集到约 5.5ml 上清液,且吸取上清液过程中极易吸进粉状药粒。如此,二级离心后,收集的细菌数目大大减少,药物的影响仍然存在。此法也不可取。

④自然沉降上清液法:使用此法 1:100 以后的稀释度平板:药物颜色基本消除;梯度间比例正常;菌落色素正常。而且,灵敏度也符合要求(1:1000)以内稀释度

以内,呈现正常生长。虽回收率只有 38.5%,但梯度间(10⁻²与 10⁻³)比例正常,故不认为此二梯度仍有抑菌作用,而考虑是该药的杀菌作用所致。实际检验中,只需确定活菌数,不可能也没有必要确定药品中被杀灭的细菌。此外,自然沉降上清液法操作较为简便,比常规法只多了一个静置的步骤。故认为此法适于该品菌检。

以上是细菌试验的结果,霉菌复核结果表明该药品对试验菌——白色念株菌亦存在抑制作用,各种方法的试验结果与上述细菌试验结果基本一致。这一结果支持选用自然沉降上清液法。

⑤扩大培养基法:从表 1 结果推断,扩大试验中培养基的用量,必须扩大百倍以上,对于细菌及霉菌计数无实际意义,经试验,对大肠杆菌的检验适用,结果见表 2。

表 2 大肠杆菌扩大培养基试验结果

B.L(ml)	1:10 供试液(ml) *1	相当于 10ml 1:10 供试液于 BL(ml)	加菌(个)	BL 中生长情况	EMB 中生长情况 *2
100	0	对照	100	+++ *3	+++
1000	0	对照	100	+++ *3	+++
100	10	100	100	-	-
200	10	200	100	-	-
400	10	400	100	-	1 菌落
800	10	800	100	-	2 菌落
1000	10	1000	100	-	+
100	0.5	2000	100	-	++
100	0.25	4000	100	+ *3	+++
100	0.125	8000	100	++ *3	+++
100	1:100 供试液 1ml	10000	100	++ *3	+++
100	1:100 供试液 0.5ml	20000	100	+++ *3	+++

注: *1 使用自然沉降上清液; *2 从 BL24h 培养液中取一环于 EMB 平板上作三区连续划线; *3 表示产泡沫; BL 中生长情况 -: 表示未见明显生长; +: 表示混浊程度; EMB 中生长情况: -: 无菌落生长; ++: ≤1 个划线区生长; +++: 2 个划线区生长; ++++: 3 个划线区生长

表 2 结果表明,扩大培养基法适合于该药品的大肠杆菌检验。从 BL 液中生长情况来看,BL 必须扩大到 20000ml 才能达到与空白完全一致的效果,但从 EMB 中生长情况看,只需扩大 BL 至 4000ml 即能与空白一样出现丰富生长。考虑到方法的实用价值,认为扩大到 1000ml 即可。

3.2 方法的修饰:通过上述结果的比较,已看出自然沉降上清液法比较合适(见表 3)。

表 3 沉降时间试验结果

沉降时间(min)	平板菌落计数
0	0
10	320
20	330
30	310
40	410
60	410

表 3 表明,静置 40min 后菌落数趋于稳定,且明显多于 40min 前所计数目。这一点与肉眼观察基本一致:供试液需静置至少 40min 后才可吸取上清液而无肉眼可见的粉末状悬浮物。空白试验表明,在无样品情况下,菌悬液静置 40min 上清液计数约降低 4%,60min 约降低 13%,故认为静置 40min 较为合适(见表 4)。

表 4 可看出,无论细菌或是霉菌, 10^{-2} 与 10^{-3} 呈现正常梯度生长, 10^{-1} 则不然。故认为虽静置 40min,

表 4 报告梯度选择试验结果

梯度	-1	-2	-3
细菌菌落	600	126	16
霉菌菌落	47	18	2

10^{-1} 梯度仍有抑菌作用, 10^{-2} 及其后的稀释度则基本正常,因而计数结果的报告应以后者为准。就是说,在采用自然沉降上清液法的同时,必须结合稀释的报告方法。

3.3 方法的实用性考核:采用上述建立的方法对 6 批待测样品进行试验,结果见表 5。

表 5 6 批样品实测结果

样品批号	细 菌		霉 菌		大肠杆菌
	10^{-1}	10^{-2}	10^{-1}	10^{-2}	
930815	0	4	3	7	-
930816	0	5	4	6	-
930821	0	2	24	30	-
940202	0	0	0	0	-
940203	0	0	0	0	-
940204	0	0	0	0	-

表 5 结果表明,采用自然沉降上清液的方法能测定样品中的细菌数与霉菌数,且与污染过试验菌的样品检测结果一致, 10^{-2} 稀释度菌落计数多于 10^{-1} 稀释度。这证明,采用自然沉降上清液法结合稀释报告法是合理的、可行的。