

醇-0.1%磷酸水溶液及甲醇-水进行梯度洗脱、切换波长测定,结果表明以甲醇-水为流动相进行梯度洗脱时,待测组份峰形理想,分离效果好,操作简便。

REFERENCES

- [1] 中国药典.一部[S]. 2010: 95-96, 230-231, 263-264.
- [2] 国家药品标准(试行) WS-725(Z-151)-2001 [S]. 2001.
- [3] FU Y, ZHU Z J, HUANG S, et al. Determination of five saikosaponins in *Bupleurum yinchowense* by HPLC [J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2011, 23(3): 494-497.
- [4] LIU Y Q, CAI Q. HPLC determination of atractylenolide I and atractylenolide III in 50 batches crude drugs and slices of *Atractylodes macrocephala* Koidz. from different sources [J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2012, 32(7): 1249-1252.
- [5] WU H, ZHAO W L, SHAN G S, et al. Simultaneous determination of atractylenolide I, II, III in *Atractylodes Macrocephalae* Rhizoma with and without fried with bran by HPLC wavelength switching [J]. Chin Tradit Pat Med(中成药), 2013, 35(11): 2484-2487.
- [6] GUO Q L, LU W Q, ZENG L P, et al. HPLC determination of naringin, hesperidin and neohesperidin in Citri Reticulatae Pericarpium and Aurantii Fructus extract [J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学), 2012, 18(20): 100-104.
- [7] LIU Y C, ZHANG J. Simultaneous determination of hesperidin and naringin in Orange Tangerine Loquat capsule by HPLC [J]. Anhui Med Pharm J(安徽医药), 2013, 17(12): 2044-2045.
- [8] 中国药典 2010 年版.一部 [S]. 2010: 263-264.
- [9] ZHAO S M. Determination of saikosaponin a, d in Radix Bupleuri oral liquids by improved HPLC [J]. China Pharm(中国药师), 2013, 16(5): 705-707.

收稿日期: 2014-06-12

地衣芽孢杆菌活菌颗粒杂菌检查方法验证

郑小玲¹, 陈爽¹, 章鑫萍², 王知坚¹ (1.浙江省食品药品检验研究院, 杭州 310004; 2.浙江京新药业股份有限公司, 浙江 绍兴 312500)

摘要: 目的 建立地衣芽孢杆菌活菌颗粒杂菌检查方法。方法 控制菌检查采用平皿涂布法; 非致病性杂菌检查以杂菌率不得过 0.1% 为限度指标, 采用营养琼脂平皿涂布法 37℃ 培养; 真菌计数采用玫瑰红钠琼脂平皿涂布法 25℃ 培养。结果 控制菌检查、非致病性杂菌检查和真菌计数方法均满足中国药典 2010 年版验证试验的基本要求。结论 该方法可作为地衣芽孢杆菌活菌颗粒杂菌检查方法。

关键词: 地衣芽孢杆菌; 活菌颗粒; 杂菌检查

中图分类号: R927.1

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2015)03-0339-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2015.03.020

Validation for Contaminating Microorganisms Test in *Bacillus Licheniformis* Particles

ZHENG Xiaoling¹, CHEN Shuang¹, ZHANG Xinping², WANG Zhijian¹ (1.Zhejiang Institute for Food and Drug Control, Hangzhou 310004, China; 2.Zhengjiang Jingxin Pharmaceutical Co., Ltd., Shaoxing 312500, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a method for contaminating microorganisms test in *Bacillus licheniformis* particles. **METHODS** Spread plate method was used in the control bacteria examination; the non-pathogenic microbes was counted in nutrient agar and growth at 37℃, the maximum acceptable count was suggested in 0.1% of total microbes; the sodium rose Bengal agar and growth at 25℃ was used to do the fungi count. **RESULTS** The method was accepted in validation test of Chinese pharmacopoeia 2010. **CONCLUSION** The method can be used in contaminants test for *Bacillus licheniformis* particles control.

KEY WORDS: *Bacillus licheniformis*; viable particles; contaminating microorganisms test

地衣芽孢杆菌活菌颗粒属于微生态活菌制剂, 用于治疗急慢性肠炎、痢疾及各种因素引起的肠道菌群失调、腹泻等^[1-2]。杂菌率是地衣芽孢杆菌活菌颗粒质量控制的重要指标。中国药典

2010 年版三部微生态活菌制品总论项下附录 3 虽列出微生态活菌制品杂菌检查法的一般规定, 但并没有列出各个品种项下不同活菌制剂杂菌检查法的具体检测方法^[3]。由于微生态活菌制剂种类繁多

作者简介: 郑小玲, 女, 硕士生, 主管药师

Tel: (0571)86459427

E-mail: linghuxiao83@163.com

多,不同种属的功能微生物培养检测方法各有差异,杂菌检查方法也不尽相同。为了安全有效地控制地衣芽孢杆菌活菌颗粒的质量,笔者根据中国药典微生物限度检查法中方法验证规定对本品的杂菌检查方法开展相关的方法学验证研究^[3]。本实验对地衣芽孢杆菌活菌颗粒杂菌检查项目中的控制菌检查、非致病性杂菌和真菌计数分别开展了方法学验证,建立了地衣芽孢杆菌活菌颗粒杂菌检查方法,并对微生物限度检查法中方法验证规定对本品的杂菌检查方法开展相关的方法学验证研究^[3]。本实验对地衣芽孢杆菌活菌颗粒杂菌检查项目中的控制菌检查、非致病性杂菌和真菌计数分别开展了方法学验证,建立了地衣芽孢杆菌活菌颗粒杂菌检查方法,并对微生物限度检查法中方法验证规定对本品的杂菌检查方法开展相关的方法学验证研究^[3]。

1 仪器与材料

1.1 仪器

调速多用振荡器 HY-4 型(国华电器有限公司); Vitek 2 Compact 全自动生化分析仪(法国梅里埃)。

1.2 菌株

枯草芽孢杆菌[CMCC(B)63501]、金黄色葡萄球菌[CMCC(B)26003]、大肠埃希菌[CMCC(F)44102]、铜绿假单胞菌[CMCC(B)10104]和白色念珠菌[CMCC(F)98001]均由中国医学细菌保藏中心提供;黑曲霉[CMCC(F)98003,中国药品生物制品检定所];痢疾志贺氏菌(CGMCC1.1869,中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心)。

1.3 培养基与试剂

营养琼脂培养基、玫瑰红钠琼脂培养基、三塘铁琼脂培养基(TSI)、PDP 琼脂培养基和半固体琼脂由青岛海博生物技术有限公司提供;胆盐乳糖培养基、4-甲基伞形酮葡萄糖苷酸培养基(MUG)、曙红亚甲蓝培养基、沙门、志贺菌属培养基和甘露醇氯化钠琼脂培养基由北京三药科技开发公司

提供;NAC 液体培养基和 NAC 琼脂培养基由北京奥博星生物技术有限公司提供;7.5%氯化钠肉汤培养基(北京陆桥技术有限责任公司)。以上培养基适用性检查均符合中国药典 2010 年版规定^[3]。氧化酶试纸和兔血浆由青岛海博生物技术有限公司提供;氯化三苯基四氮唑(TTC,国药集团化学试剂有限公司);所用试剂均为分析纯。

1.4 样品

地衣芽孢杆菌活菌颗粒(浙江京新药业股份有限公司,活菌含量:2.2×10⁹ CFU·g⁻¹,批号:1305242,1305243,1305244,规格:0.5 g)。

2 方法与结果

2.1 菌液制备

接种金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、痢疾志贺氏菌和大肠埃希菌的新鲜培养物至营养肉汤培养基中,35℃培养 24 h;接种枯草芽孢杆菌新鲜培养物至营养琼脂斜面,35℃培养 24 h;接种白色念珠菌的新鲜培养物至改良马丁培养基中,25℃培养 48 h;接种黑曲霉的新鲜培养物至改良马丁琼脂培养基中,25℃培养 5 d。每种新鲜培养物按不同实验要求稀释制备菌悬液。

2.2 控制菌检查方法验证

2.2.1 方法 取样品 1 g,加至 9 mL 不同的控制菌检查用培养基中,再加入 10~100 CFU 对应控制菌作为试验组,于 37℃培养 18 h 后,分别取培养物 0.1 mL 涂布接种于相应的选择性琼脂培养基,1 式 3 份。除志贺氏菌、沙门氏菌检查培养 40 h 外,其余均培养 18 h。同时不加试验菌液其余同试验组操作,作为供试品对照组。不同控制菌检查用增菌培养基和选择性琼脂培养基,见表 1。涂布培养完取试验组的可疑菌落按药典规定进行生化鉴定。

表 1 不同控制菌检查对应的增菌培养基和选择性琼脂培养基

Tab. 1 The enrichment culture mediums and selective agar mediums of different specified microorganisms tests					
控制菌	大肠埃希菌	志贺氏菌	沙门氏菌	铜绿假单胞菌	金黄色葡萄球菌
增菌培养基	胆盐乳糖培养基	胆盐乳糖培养基	胆盐乳糖培养基	NAC 液体培养基	7.5%氯化钠肉汤培养基
选择性琼脂培养基	曙红亚甲蓝培养基	沙门、志贺菌属培养基	沙门、志贺菌属培养基	NAC 琼脂培养基	甘露醇氯化钠琼脂培养基

2.2.2 结果 控制菌检查选择性培养结果中试验组均有典型菌落生长;供试品对照组除甘露醇氯化钠琼脂平板外,均无菌生长。供试品对照组中甘露醇氯化钠琼脂培养基上长有淡黄色菌落,试验组中该平板上除长有金黄色菌落外,也长有淡黄色菌落。取试验组和供试品对照组中的淡黄色

菌落采用 Vitek 进行生化鉴定,鉴定结果均为地衣芽孢杆菌,因此表明地衣芽孢杆菌在 7.5%氯化钠肉汤培养基和甘露醇氯化钠琼脂培养基中均能够生长。控制菌检查方法验证详细结果见表 2 和表 3。从表 2 和表 3 可见试验组均检出阳性控制菌,因此控制菌检查可采用上述涂布培养方法进行检验。

表 2 试验组和供试品对照组选择性培养结果

Tab. 2 Results of selective culture for specified microorganisms test

批号	组 别	大肠埃希菌	志贺氏菌	沙门氏菌	铜绿假单胞菌	金黄色葡萄球菌
1305242	试验组	典型菌落生长	典型菌落生长	典型菌落生长	典型菌落生长	典型菌落生长
	供试品对照组	-	-	-	-	淡黄色菌落生长
1305243	试验组	典型菌落生长	典型菌落生长	典型菌落生长	典型菌落生长	典型菌落生长
	供试品对照组	-	-	-	-	淡黄色菌落生长
1305244	试验组	典型菌落生长	典型菌落生长	典型菌落生长	典型菌落生长	典型菌落生长
	供试品对照组	-	-	-	-	淡黄色菌落生长

注：“-”代表无菌落生长。

Note: “-” means no bacterial growth.

表 3 试验组疑似菌落生化鉴定结果

Tab. 3 Results of biochemical identification for test group suspected colonies

疑似菌	1305242				1305243				1305244			
大肠埃希菌	染色	MUG	靛基质		染色	MUG	靛基质		染色	MUG	靛基质	
	G ⁻ 杆菌	+	+		G ⁻ 杆菌	+	+		G ⁻ 杆菌	+	+	
志贺氏菌	染色	TSI	动力	生化鉴定	染色	TSI	动力	生化鉴定	染色	TSI	动力	生化鉴定
	G ⁻ 杆菌	+	-	+	G ⁻ 杆菌	+	-	+	G ⁻ 杆菌	+	-	+
沙门氏菌	染色	TSI	生化鉴定		染色	TSI	生化鉴定		染色	TSI	生化鉴定	
	G ⁻ 杆菌	+	+		G ⁻ 杆菌	+	+		G ⁻ 杆菌	+	+	
铜绿假单胞菌	染色	氧化酶	绿脓菌素		染色	氧化酶	绿脓菌素		染色	氧化酶	绿脓菌素	
	G ⁻ 杆菌	+	+		G ⁻ 杆菌	+	+		G ⁻ 杆菌	+	+	
金黄色葡萄球菌	染色	血浆凝固酶			染色	血浆凝固酶			染色	血浆凝固酶		
	G ⁺ 球菌	+			G ⁺ 球菌	+			G ⁺ 球菌	+		

注：TSI “+”代表三糖铁琼脂穿刺实验结果符合疑似菌的实验特征；生化鉴定“+”代表采用 Vitek 2 Compact 全自动生化分析仪鉴定检出疑似菌；其余“+”代表阳性反应，“-”代表阴性反应。

Note: TSI “+” means positive reaction; biochemical identification “+” means the suspected bacteria was checked by Vitek 2 Compact; other “+” means positive reaction, “-” means negative reaction.

2.3 非致病性杂菌检查和真菌计数方法验证

在本产品检测项目中有一项效力实验，效力实验表明地衣芽孢杆菌对金黄色葡萄球菌有明显的抑制作用，故在非致病性杂菌检查方法学验证时，金黄色葡萄球菌不列为验证菌的范围。根据中国药典微生物限度检查法方法验证规定，选用了大肠埃希菌、枯草芽孢杆菌、白色念珠菌和黑曲霉作为方法验证实验用菌株^[3]。本品的非致病性杂菌检查参照中国农业行业标准(微生物饲料添加剂-地衣芽孢杆菌 NY/T 1461-2007)规定，以地衣芽孢杆菌的杂菌率不得过 0.1%为限度指标进行验证^[4]。

2.3.1 供试液的制备 非致病性杂菌检查：取样品 1 g，加 0.9%无菌氯化钠溶液 9 mL，振荡混匀后再取 1：10 供试液 0.5 mL，加 0.9%无菌氯化钠溶液 9.5 mL，混匀制成 1：200 供试液；之后按 10 倍梯度关系稀释，制成 1：2×10⁶ 供试液作为对照

组供试液。再取 2 份样品各 1 g，分别加 0.9%无菌氯化钠溶液 9 mL，振荡混匀后再分别取 1：10 供试液 0.5 mL，加 0.9%无菌氯化钠溶液 8.5 mL，振荡混匀后再分别加“2.1”项下浓度范围为(0.5~1)×10⁷ CFU·mL⁻¹ 的大肠埃希菌和枯草芽孢杆菌的菌液各 1 mL 混匀制成 1：200 供试液；之后按 10 倍梯度关系稀释，制成 1：2×10⁶ 供试液作为不同试验组供试液。

真菌计数：取样品 1 g，加 0.9%无菌氯化钠溶液 9 mL，放置在振荡器中混匀制成对照组供试液。同时取 2 份样品各 1 g，分别加 0.9%无菌氯化钠溶液 8 mL，振荡混匀后再分别加“2.1”项下浓度范围为(0.5~1)×10⁴ CFU·mL⁻¹ 的白色念珠菌和黑曲霉的菌液各 1 mL，混匀制成不同试验组供试液。

2.3.2 方法 非致病性杂菌检查方法验证：取试验组供试液 1 mL，平均涂布接种于 5 个营养琼脂

平皿中,一式3份,置37℃培养,计数5块平皿实验用菌株菌落数之和作为试验组;取对照组供试液1 mL同法操作作为供试品对照组;不加入样品,同法测定加入相应的试验菌,作为菌液组。

真菌计数方法验证:取试验组供试液0.1 mL,涂布接种于玫瑰红钠琼脂平皿中,一式3份,置25℃培养,计数菌落数作为试验组;取对照组供试液0.1 mL同法实验作为供试品对照组;不加入样品,同法测定加入相应的试验菌,作为菌液组。计算回收率:回收率/%=[(试验组平均菌落数-供试品对照组平均菌落数)/菌液组平均菌落数]×100%。

2.3.3 结果 试验组中的大肠埃希菌、枯草芽孢杆菌、白色念珠菌和黑曲霉对3个批号样品回收率均>70%,符合中国药典对药品微生物验证试验要求,结果见表4。因此非致病性杂菌检查和真菌计数可按上述方法进行检查。

表5 地衣芽孢杆菌活菌颗粒样品杂菌检查结果

Tab. 5 The results of contaminants test for *Bacillus licheniformis* particles

杂 菌	批 号					
	1305242	1305243	1305244	1305231	1305232	1305233
大肠埃希菌	-	-	-	-	-	-
志贺氏菌	-	-	-	-	-	-
沙门氏菌	-	-	-	-	-	-
铜绿假单胞菌	-	-	-	-	-	-
金黄色葡萄球菌	-	-	-	-	-	-
非致病性杂菌检查(杂菌率)/%	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
真菌计数/CFU·g ⁻¹	<100	<100	<100	<100	<100	<100

注:“-”代表该项致病菌未检出。

Note:“-” means the pathogenic bacteria was not checked out.

3 讨论

微生态制剂一般采用显微镜检法和微生物学检验进行杂菌含量的检测。前者只能大致了解微生物的数量,无法确切区分活菌与死菌、功能微生物与杂菌;后者主要通过平板法培养计数^[5]。中国药典2010年版中微生态制剂杂菌检查是采用选择性培养基对样品进行稀释涂布平板培养检测。本实验采用选择性培养基平板涂布培养对地衣芽孢杆菌活菌颗粒进行控制菌检查和真菌计数验证,结果满足验证试验的要求。

但对非致病性杂菌检查进行方法验证时,由于样品中含地衣芽孢杆菌活菌数高达1×10⁹ CFU·g⁻¹以上,而杂菌检查中非致病性杂菌的菌落数限度仅为样品的百万分之一(中国药典规定口服微生态活菌制品成品的非致病性杂菌数不得超过1 000 CFU·g⁻¹),在非选择性平板上巨量的功

表4 4种试验菌有效性验证回收试验结果

Tab. 4 Results of validation recycling test for four test organisms

菌种	批号	实验组/ CFU	菌液组/ CFU	样品对照 组/CFU	实验组 回收率/%	平均回 收率/%
大肠埃希菌	1305242	83	99	0	84	83
	1305243	79	99	0	80	
	1305244	84	99	0	85	
枯草芽孢杆菌	1305242	53	60	0	88	89
	1305243	57	63	0	90	
	1305244	54	60	0	90	
白色念珠菌	1305242	58	59	0	97	100
	1305243	61	59	0	103	
	1305244	60	59	0	101	
黑曲霉	1305242	58	57	0	103	100
	1305243	57	57	0	101	
	1305244	54	57	0	95	

2.4 样品杂菌检查

取6批地衣芽孢杆菌活菌颗粒按照“2.2”和“2.3”项进行杂菌检查,结果见表5。

能微生物活菌会掩盖计数平板中的杂菌,因此对其进行菌落计数非常困难。

笔者认为口服微生态活菌制品的非致病性杂菌数控制指标应和微生态制剂产品本身活菌浓度挂钩比较适宜,所以应以杂菌率作为控制指标。例如本品可参照中国农业行业标准(微生物饲料添加剂-地衣芽孢杆菌 NY/T 1461-2007)规定,以地衣芽孢杆菌的杂菌率不得过0.1%为限度指标^[4]。杂菌率是指杂菌占总菌数的百分率,即杂菌率=杂菌数/(功能微生物的有效活菌数+杂菌数)×100%。此限度杂菌率的控制检查可依据中国药典2010年版规定采用营养琼脂培养基用于非致病性杂菌的计数。因此,“2.4”项下本品非致病性杂菌检查以杂菌率不得过0.1%为限度指标,将样品稀释至含地衣芽孢杆菌约1 000 CFU·mL⁻¹,然后取1 mL平均分至5个营养琼脂平皿中,玻棒涂匀后培养计

数杂菌和地衣芽孢杆菌。作者采用此方法对本品的非致病性杂菌检查进行方法学验证,结果证明该方法准确可靠,可作为同类微生物制剂产品质量控制、安全评价的参考。

一般根据 pH 值、抑制剂和指示剂等原理配制选择性培养基^[6]。本实验也尝试了 pH 法和指示剂法对非致病性杂菌计数方法进行研究。因地衣芽孢杆菌对酸度特别敏感,所以将营养琼脂培养基的 pH 值分别调为 5.0, 5.5, 6.0 和 6.5 共 4 个梯度,结果前 3 个 pH 值虽然对地衣芽孢杆菌的生长有一定的抑制作用,但是对验证菌株大肠埃希菌和枯草芽孢杆菌也有抑制作用,而当 pH 值 6.5 时对地衣芽孢杆菌已无明显抑制作用。指示剂法采用了营养琼脂培养基中添加一定浓度的 TTC, TTC 添加后可以将验证菌株大肠埃希菌和地衣芽孢杆菌区分开来,从而计算出大肠埃希菌的回收率,但是验证菌株枯草芽孢杆菌和地衣芽孢杆菌几乎无法区分。可见若采用选择性培养基对样品进行杂菌计数,选择性培养基除抑制目的菌外,一般也会抑制其他非致病性杂菌。如马青竹等采用麦康凯琼脂选择性培养基对多菌株混合微生物制剂产品进行杂菌计数,该培养基同时抑制部分革兰

氏阴性菌,从而无法对杂菌的总数进行准确的计数^[7]。此外作为活菌制剂产品,不同规格产品中的活菌浓度差异较大,因此达到药效浓度的剂量差异也对应较大,如果产品标准中参照口服药微生物限度标准^[8],仍然以单位重量的绝对杂菌数进行产品的质量控制显然并不科学。因此药典中口服微生物活菌制品成品非致病性杂菌数不得超过 1 000 CFU·g⁻¹ 这一指标值得商榷。

REFERENCES

[1] 郭云霞. 整肠生佐治 46 例小儿肠炎的临床分析[J]. 中国民族民间医药, 2013(9): 84.
[2] 骆稽酉, 曲淑敏. 益生菌制剂整肠生[J]. 医学综述, 2001, 7(4): 245-247.
[3] 中国药典. 三部[S]. 2010: 320-324, 附录 98-105.
[4] 中华人民共和国农业行业标准. NY/T 1461-2007 微生物饲料添加剂-地衣芽孢杆菌[S]. 2007.
[5] 张日俊. 微生物制剂的质量鉴别与选择、检测指标和标准[J]. 饲料工业, 2010, 31(20): 1-4.
[6] SUN M X. Selective enumeration of mixture and ferment milk of kinds of lactic acid bacteria [D]. Harbin: Harbin Institute of Technology, 2010.
[7] 马青竹, 李学军. 一种兽用多菌株混合微生物制剂质量标准研究[J]. 饲料工业, 2010, 31(11): 56-60.
[8] 袁佩娜. 微生物制剂安全性有效性检查方法[J]. 中国微生物学杂志, 1996, 8(5): 59.

收稿日期: 2014-06-20

本刊 2014 年论文下载排行(以“中国学术期刊网络出版总库”统计)

序号	标题	作者	刊期	下载频次
1	金钆石斛的化学成分和药理作用研究进展	张晓敏, 孙志蓉, 陈龙, 魏鑫鑫, 刘文兰	2014 年第 7 期	245
2	脂肪酸检测方法的研究进展	周文斌, 吕春明, 张宁, 吴丹, 寇芳, 魏海	2014 年第 2 期	231
3	枇杷叶总黄酮的纯化工艺及抗氧化活性研究	吕寒, 滕杰晖, 陈剑, 马丽, 任冰如, 李维林	2014 年第 1 期	160
4	细胞色素 P450 与外源物的相互作用研究进展	赵春, 李银生, 蒋美琳, 丛琳, 邱江平	2014 年第 8 期	139
5	新型给药系统和新技术在光动力疗法中的应用	吕浩, 袁园, 张金安, 郭均平	2014 年第 1 期	134
6	雷替曲塞的临床应用	吴婷婷, 陈丁丁, 智俊娜, 陆建伟	2014 年第 5 期	129
7	抗脑胶质瘤中药的研究进展	吕林林, 许丽娜, 彭金咏	2014 年第 8 期	127
8	大孔树脂分离纯化刺五加中紫丁香苷、刺五加苷 E 和异嗪皮啶的工艺研究	樊如强, 金学英, 胡荣, 陈鹏, 王建斌, 傅宏征	2014 年第 3 期	121
9	内皮素受体及其受体拮抗剂在心血管疾病中的作用	李培武, 伏旭, 傅仲学	2014 年第 3 期	121
10	SGLT2 抑制剂 Canagliflozin——II 型糖尿病治疗的新药	曾要富, 姚亮元, 钟爱军, 朱颖熹, 袁秀菊	2014 年第 9 期	120

来源数据截止至 2015 年 3 月 13 日