

Research on Microbiological Limit Test of ZuoGui Pills

Yanling Fang*, Huanmin Zhu

Guangdong Institute for Drug Control, Guangzhou Guangdong
Email: *598801272@qq.com

Received: May 1st, 2020; accepted: May 15th, 2020; published: May 25th, 2020

Abstract

Objective: To establish a microbial limit test method of ZuoGui pills through the validation of different manufacturers of the same species methodology verification. **Methods:** According to the general guidelines of 1105, 1106, and 1107 in Chinese Pharmacopoeia 2015, the experiments were performed by using plate method and routine method to validate the aerobic bacteria, mycete, and saccharomycetes test methods for determination of ZuoGui pills. **Results:** The samples from 2 manufacturers had inhibition to *Bacillus subtilis*, the inhibition disappeared when 1:50 plate method was used, and the recovery rate was over 50%. **Conclusion:** When performing microbial limit tests of the samples from 3 manufacturers, the plate method should be used for aerobic bacteria count, and the routine method can be used for mycete, saccharomycetes count and control bacteria test.

Keywords

Zuogui Pills, Chinese Pharmacopoeia 2015, Microbial Limit Test, Methodology Validation

左归丸微生物限度检查方法的研究

方燕玲*, 朱欢敏

广东省药品检验所, 广东 广州
Email: *598801272@qq.com

收稿日期: 2020年5月1日; 录用日期: 2020年5月15日; 发布日期: 2020年5月25日

摘要

目的: 通过对不同厂家同一品种的方法学验证, 建立左归丸的微生物限度检查方法。 **方法:** 按照《中国药典》2015年版通则1105、1106和1107, 用平皿法及常规法对左归丸进行需氧菌、霉菌及酵母菌和控制菌检查法的适用性试验。 **结果:** 有两个厂家生产的左归丸对枯草芽孢杆菌有抑菌性, 采用1:50平皿法

*通讯作者。

后, 抑菌性消除, 回收率为0.5~2.0。结论: 三个厂家生产的左归丸在进行微生物限度检查时, 需氧菌计数可用平皿法, 霉菌及酵母菌计数和控制菌检查可采用常规法。

关键词

左归丸, 中国药典2015年版, 微生物限度检查, 方法验证

Copyright © 2020 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

左归丸是由我国明代的温补派代表名医张景岳从六味地黄丸化裁而成, 该处方载于其所著《景岳全书·新方八阵》。全方由熟地黄、菟丝子、牛膝、龟板胶、鹿角胶、山药、山茱萸、枸杞子八味中药组成, 有滋阴补肾的功效, 用于真阴不足, 腰酸膝软, 盗汗遗精, 神疲口燥[1]。目前市面上主要有三个厂家生产的左归丸, 三个厂家提供的微生物限度检查方法存在一定的差异, 具体体现在, 虽然这三个厂家的霉菌及酵母菌、大肠埃希菌、耐胆盐革兰阴性菌和沙门菌均采用常规法进行微生物限度检查, 但是对于需氧菌计数检查, A 厂家采用 1:500 平皿法取 5 mL 平行试验, B 厂家采用 1:100 平皿法, C 厂家则采用 1:10 平皿法对其进行微生物限度检查。对比这三个厂家的方法, A、B 厂家与 C 厂家还是有一定差异的, 而且 A 厂家的方法操作比较繁琐。鉴于这三个厂家的左归丸配方成分稳定, 本文对三个厂家的 9 批样品进行微生物限度的方法学验证, 经过一系列的研究对比, 结果表明, 三个厂家生产的左归丸的抑菌性差异不大, 这三个厂家的左归丸可建立科学、合理、方便操作的微生物限度检查方法[2]。

2. 实验材料

2.1. 仪器

1379 生物安全柜(Thermo), JA21002 电子天平(上海越平科学仪器有限公司), ED-13A 水浴箱(Julabo), Lab dancer 漩涡混合器(IKA), BRE240 生化培养箱(Froilabo)。

2.2. 培养基及批号

胰酪大豆胨液体培养基(1083591)、沙氏葡萄糖液体培养基(3106032)、胰酪大豆胨琼脂培养基(1901162)、沙氏葡萄糖琼脂培养基(1905062)、麦康凯液体培养基(1075425)、麦康凯琼脂培养基(1069751)、肠道菌增菌液体培养基(1808062)、紫红胆盐葡萄糖琼脂(180704)、RV 沙门菌增菌液体培养基(3304013)、木糖赖氨酸脱氧胆酸盐琼脂(180524)。以上培养基均购自广东环凯微生物科技有限公司。

2.3. 菌株

大肠埃希菌(*Escherichia coli*) [CMCC(B)44102]、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) [CMCC(B)26003]、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) [CMCC(B)63501]、白色念珠菌(*Candida albicans*) [CMCC(F)98001]、黑曲霉(*Aspergillus niger*) [CMCC(F)98003]、乙型副伤寒沙门菌(*Salmonella paratyphi B*) [CMCC(B)50094]、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*) [CMCC(B)10104]均购自中国食品药品检定研究院, 由专人专管, 定期鉴定其生物学特性。

2.4. 样品

3 家生产企业生产的 9 批样品, 按顺序编号, A 厂家(批号 18030030、18030048、18030044), B 厂家(批号 18090901、18070702、180605), C 厂家(批号 190110、181101、190101)。

3. 实验方法与结果

3.1. 菌液制备

按《中国药典》2015 年版四部通则[3]菌液制备项下要求, 用 0.9% 无菌氯化钠溶液制备菌液。计数方法适用性试验所用各菌株菌液浓度为 $10^3 \sim 10^4$ cfu/mL, 控制菌检查方法适用性试验所用各菌株菌液含菌量每 1 mL 不大于 100 cfu。

3.2. 供试液制备

取本品 10 g, 加胰酪大豆胨液体培养基至 100 mL, 用匀浆仪混匀, 作为 1:10 的供试液。取 1:10 的供试液适量, 加胰酪大豆胨液体培养基分别制成 1:20、1:50 的供试液。

3.3. 计数方法适用性试验

3.3.1. 试验组

取“2.2”项下的供试液, 按试验要求(需氧菌计数 5 管, 霉菌及酵母菌计数 2 管)每管加入 9.9 mL, 分别加入“2.1”项下的各菌液 0.1 mL, 取 1 mL 注入平皿中, 平行操作 2 个平皿, 加入相应培养基, 测定试验组中的菌落数, 结果分别见表 1、表 2、表 3。

3.3.2. 菌液对照组

取“2.1”项下的各菌液 0.1 mL 分别加入到 9.9 mL 胰酪大豆胨液体培养基中, 取 1 mL 注入平皿中, 平行操作 2 个平皿, 加入相应培养基, 测定菌液中的菌落数, 结果分别见表 1、表 2、表 3。

3.3.3. 供试品对照组

取 0.9% 无菌氯化钠溶液 0.1 mL 加入到“2.2”项下的 9.9 mL 供试液中, 取 1 mL 注入平皿中, 平行操作 2 个平皿, 加入相应培养基, 测定供试品中的菌落数, 结果分别见表 1、表 2、表 3。

3.4. 计算公式

$$\text{各菌株回收比值} = \frac{(\text{试验组的平均菌落数} - \text{供试品对照组的平均菌落数})}{\text{菌液组的平均菌落数}}$$

3.5. 结果

3.5.1. 需氧菌总数预试验结果见表 1

Table 1. Pre-test of recoveries of validation of aerobic bacteria
表 1. 需氧菌方法适用性预试验回收率

厂家	批号	方法	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
A	18030044	1:10	0.7	1.4	0.3	0.8	0.9
		1:20	0.7	1.9	0.5	0.6	1.1
B	180605	1:10	0.7	1.3	0.3	1.0	0.9
		1:20	0.8	1.5	0.3	0.7	0.9

Continued

C	190110	1:10	0.6	1.6	0.7	1.0	1.1
		1:20	0.7	1.6	0.8	0.7	1.1

由上表 1 可见, 取 1:20 的供试液, 用平皿法时, 不能消除 A、B 厂家样品对枯草芽孢杆菌的抑制作用, 该方法不适合 A、B 厂家品种的需氧菌计数检查。因此拟用 1:50 的供试液平皿法对 A、B 厂家生产的品种进行验证, 方法结果如下。

3.5.2. 需氧菌总数试验结果见表 2

Table 2. Recoveries of validation of aerobic bacteria

表 2. 需氧菌方法适用性试验回收率

厂家	批号	方法	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
A	18030030		0.8	1.3	0.9	0.9	1.0
	18030048	1:50	1.0	0.9	0.6	0.8	1.2
	18030044		1.7	1.3	1.1	0.9	0.8
B	18090901		0.7	1.2	1.0	1.4	1.2
	18070702	1:50	1.2	1.0	0.7	0.8	0.9
	180605		1.3	1.1	1.1	1.2	0.7
	190110		0.6	1.6	0.7	1.0	1.1
C	181101	1:10	0.9	1.2	0.7	1.1	1.1
	190101		0.8	1.2	0.9	1.2	0.7

由上表 2 可见, 取 1:50 的供试液, 用平皿法时, A、B 厂家各批号的供试品各菌株 3 次试验的回收率均在 0.5~2 范围内, 因此 A、B 厂家的需氧菌计数可用 1:50 平皿法检查, C 厂家的需氧菌计数可用 1:10 平皿法检查。

3.5.3. 霉菌和酵母菌总数结果见表 3

Table 3. Recoveries of validation of mycete and saccharomycetes

表 3. 霉菌和酵母菌方法适用性试验回收率

厂家	批号	白色念珠菌	黑曲霉
A	18030030	1.5	0.9
	18030048	1.2	0.7
	18030044	0.8	1.2
	18090901	1.3	0.9
B	18070702	1.1	0.7
	180605	0.7	0.9
	190110	1.2	0.9
C	181101	1.0	0.8
	190101	2.0	0.9

由上表 3 可见, 取 1:10 的供试液, 用平皿法时, 白色念珠菌和黑曲霉 2 个菌株 3 次试验的回收均在 0.5~2 范围内, 表明这三个厂家的霉菌和酵母菌计数可用 1:10 平皿法检查。

3.6. 控制菌检查方法适用性试验

按《中国药典》2015 年版四部通则控制菌检查法操作, 结果见表 4。

Table 4. Test results of the applicability of specified microorganisms

表 4. 控制菌方法适用性试验结果

	耐胆盐革兰阴性菌	大肠埃希菌	沙门菌检查
培养基体积	10 mL	100 mL	100 mL
阳性对照组	生长	生长	生长
阴性对照组	未生长	未生长	未生长

由上表 4 可见, 本品的耐胆盐革兰阴性菌、大肠埃希菌、沙门菌的培养基体积可分别为 10 mL、100 mL、100 mL。

4. 讨论

通过对三个厂家的 9 批左归丸微生物限度检查方法适用性试验, A、B 厂家生产的左归丸对枯草芽孢杆菌有一定的抑菌性, 需氧菌计数采用 1:50 平皿法去除抑菌性, 对霉菌及酵母菌和控制菌没有抑菌性, 可用常规法对其进行微生物限度检查。C 厂家生产的左归丸对需氧菌、霉菌及酵母菌和控制菌均无抑菌性, 均可用常规法对其进行微生物限度检查。从左归丸的配方组成中, 我们发现, 除了山茱萸[4]一味中药外, 其他七味中药均无抑菌性, 由此可见, A、B 厂家的左归丸对枯草芽孢杆菌有一定的抑菌性可能跟这一味药的含量有一定关系。当然, 这也可能跟处方中中药材产地来源、采收季节、等级品质不同有关, 也有可能跟制剂使用的辅料不同、生产环境不同有一定关系, 这需要进一步的溯源研究。通过这一次的研究表明, 第一, 根据《中国药典》2015 年版四部 1105 非无菌产品微生物限度检查: 微生物计数法规定, 为确认供试品中的微生物能被充分检出, 首先应选择最低稀释级的供试液进行计数方法适用性试验。选择最低稀释级的供试液是保证方法的检测限和定量限的基本要求, 旨在供试品中的微生物被充分检出, 特别是对于某些微生物限度要求较为严格的供试品[5]; 第二, A、B 厂家的需氧菌计数方法不需要用原厂家提供的繁琐的方法, 只需要用 1:50 平皿法, 这样不仅能够减少工作量, 降低检验成本, 而且更能够充分检出该供试品中的微生物; 第三, 左归丸对验证试验中的枯草芽孢杆菌比较敏感, 在进行日常的需氧菌计数验证时, 可考虑仅用枯草芽孢杆菌作为需氧菌计数验证的对照菌; 第四, 左归丸为水蜜丸, 针对该水蜜丸剂硬度比较强, 制备供试液时一般建议加入稀释液后放置 10 min 左右再进行匀浆, 这样均质效果会更好, 更能有效控制检验结果。很显然, 对左归丸建立科学、合理、方便操作的微生物限度检查方法是有必要的, 能够减少左归丸微生物日常检测工作量, 提高检测效率和检测方法的可靠性, 从而更加有效地控制产品质量, 更好地推动该品种的质量评价与监管工作。

参考文献

- [1] 焦强, 王晓伟, 石岩, 等. 左归丸质量标准的研究和探讨[J]. 药物分析杂志, 2018, 38(4): 711.
- [2] 张艳. 丹栀逍遥丸微生物限度验证方法的建立与比对[J]. 中国卫生标准管理, 2015, 6(17): 158.
- [3] 《中国药典》2015 年版. 四部[S]. 2015: 附录 1105-1107.
- [4] 朱崇梅. 山茱萸熊果酸提取的响应面法优化及其抑菌性研究[J]. 食品工业, 2014, 35(1): 17.
- [5] 杨晓莉, 李辉, 马英英, 等. 中国药典 2015 年版非无菌产品微生物限度检查: 微生物计数法解读[J]. 药物分析杂志, 2016, 36(6): 1105.