

# 红藤消炎灌肠液微生物限度检查方法的验证试验

● 王伟东

**摘要** 目的:建立红藤消炎灌肠液微生物限度的检查方法。方法:采用薄膜过滤法对样品进行处理,消除样品的抑菌作用,排除其对试验的干扰作用。结果:该方法能有效去除红藤消炎灌肠液中的抑菌成分,使阳性试验菌生长良好。结论:本方法简便、易操作,适用于红藤消炎灌肠液微生物限度检查。

**关键词** 红藤消炎灌肠液 微生物限度检查 薄膜过滤法

红藤消炎灌肠液具清热解毒,活血化瘀功效,临床用于附件炎、盆腔炎。其成分为大血藤、野菊花、蒲公英、地丁、败酱草、三棱、莪术(醋制)、桃仁、延胡索(醋制)、香附(醋制)、木香等11味中药,因处方中多味药有抗菌、消炎的作用,对试验菌采用常规方法做微生物限度检查时,对阳性试验菌干扰,阳性试验菌的回收率达不到药典要求的不低于70%。我们采用薄膜过滤法<sup>[1]</sup>,按中国药典2010年版二部相关规定<sup>[2]</sup>进行试验,结果表明,该法省时、易操作,适用于红藤消炎灌肠液微生物限度检查。

## 1 材料

**1.1 仪器** 净化工作台(szk-202 安徽省蚌埠净化设备有限公司)、隔水式恒温培养箱(PYX\_DHS-40\*50 上海市跃进医疗器械厂)、立式灭菌器(3260J 山东新华医疗器械有限公司)、薄膜过滤器(杭州泰林生物技术有限公司)、集菌仪(H601 杭州高得医疗器械有限公司)。

**1.2 培养基** 营养肉汤培养基、营养琼脂培养基、改良马丁氏液体培养基、改良马丁氏琼脂培养基、甘露醇氯化钠琼脂培养基、溴化十六烷三甲胺琼脂培养基,均由北京陆桥技术有限公司生产。

**1.3 稀释剂** 氯化钠-蛋白胨缓冲液,北京陆桥技术有限公司生产。

**1.4 菌种** 大肠埃希菌[CMCC(B)44102]、金黄色葡萄球菌[CMCC(B)26003]、铜绿假单胞菌[CMCC(B)10104]、枯草芽孢杆菌[CMCC(B)63501]、白色念珠菌[CMCC(F)98001]、黑曲霉[CMCC(F)98003]由中国药品生物制品检定所提供,所有菌种均为第4代。

**1.5 样品** 红藤消炎灌肠液(500ml/瓶),黄石市中医院制剂室提供。

## 2 方法

### 2.1 细菌数、霉菌和酵母菌数检查方法的验证

**2.1.1 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肉汤培养基中,35℃培养18~24h,取上述新鲜培养物1ml,用0.9%无菌氯化钠溶液,稀释至活菌数50~100cfu·ml<sup>-1</sup>,备用。接种白色念珠菌的新鲜培养物至改良马丁氏液体培养基中,25℃培养18~24h,取上述新鲜培养物1ml,用0.9%无菌氯化钠溶液,稀释至活菌数50~100cfu·ml<sup>-1</sup>,备用。接种黑曲霉的新鲜培养物至改良马丁氏琼脂斜面培养基中,25℃培养1周,加5ml的0.9%无菌氯化钠溶液,洗下霉菌孢子,吸出菌液,用标准比浊管比浊,取上述新鲜培养物1ml,用0.9%无菌氯化钠溶液,稀释至活菌数50~100cfu·ml<sup>-1</sup>,备用。

**2.1.2 供试液制备** 吸取样品10ml至有无菌玻璃珠的250ml三角烧瓶中,加90ml无菌的稀释液,混匀,使成1:10的供试液。取上述供试液10ml(相当于样品1ml),加入100ml无菌稀释液中,混匀,过滤,接着用200ml的稀释剂冲洗,消除抑菌成分后,取出滤膜,菌面朝上,贴于规定的琼脂平板上培养。

• 作者单位 湖北省黄石市食品药品检验所(435000)

2.1.3 回收率测定

(1) 试验组: 分别取 1:10 的供试液 10ml (相当于样品 1ml), 各加入 100ml 无菌稀释液中, 混匀, 过滤, 接着用 400ml 的稀释剂冲洗, 预留 100ml 稀释剂各加入大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、白色念珠菌、黑曲霉菌各 1ml ( $50 \sim 100\text{cfu} \cdot \text{ml}^{-1}$ ), 按薄膜过滤法, 取出滤膜, 菌面朝上, 贴于规定的琼脂平板上, 置规定温度培养 24 ~ 72h, 逐目观察结果。

(2) 菌液组: 除不加供试液外, 其余操作同试验组。

(3) 供试品对照组: 除不加菌悬液外, 其余操作同试验组。

(4) 稀释剂对照组: 用稀释液取代供试液, 其余操作同试验组。

2.1.4 回收率计算 验证试验进行 3 次独立的平行试验, 并分别计算各试验菌每次试验的回收率。

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

(2) 稀释剂对照组的菌回收率 =

$$\frac{\text{稀释剂对照组的平均菌落数}}{\text{菌液组的平均菌落数}} \times 100\%$$

2.2 控制菌检查方法的验证

2.2.1 试验组 分别取 1:10 的供试液 10ml (相当于样品 1ml), 各加入 100ml 无菌稀释液中, 混匀, 过滤, 接着用 400ml 的稀释剂冲洗, 预留 100ml 稀释剂, 分别加入金黄色葡萄球菌液 1ml ( $50 \sim 100\text{cfu} \cdot \text{ml}^{-1}$ )、铜绿假单胞菌液 1ml ( $50 \sim 100\text{cfu} \cdot \text{ml}^{-1}$ ), 按薄膜过滤法过滤, 取出滤膜, 菌面朝上, 分别贴于甘露醇氯化钠琼脂培养基、溴化十六烷三甲胺琼脂培养基中 35℃ 培养 24h。

2.2.2 阴性对照组: 用稀释剂 10ml, 替代供试液及验证菌液, 按试验组进行检查和培养。

2.2.3 阳性对照组: 除不加供试液外, 其余操作同试验组。

3 结果

3.1 细菌数、霉菌和酵母菌数测定方法的验证结果 回收率见表 1, 该试验对 5 种菌种的回收率均高于 70%。

表 1 薄膜过滤法菌落计数及回收率测定

试验菌	平均菌落计数/ $\text{cfu} \cdot \text{ml}^{-1}$				回收率/%	
	菌液组	试验组	供试液对照组	稀释剂对照组	试验组	稀释剂对照组
枯草芽孢杆菌	80	65	0	76	81	95
	82	72	0	78	88	95
	78	66	0	72	85	92
	74	58	0	60	78	81
金黄色葡萄球菌	78	62	0	68	79	87
	82	66	0	71	80	87
	82	66	0	70	80	85
	75	61	0	68	81	91
大肠埃希菌	84	65	0	70	77	83
	68	56	0	58	82	85
	62	54	0	56	87	90
	70	60	0	62	86	89
白色念珠菌	70	58	0	60	83	86
	72	60	0	62	83	86
	66	54	0	56	82	85

3.2 控制菌检查方法的验证结果 试验组检出金黄色葡萄球、铜绿假单胞菌; 阳性对照组检出金黄色葡萄球、铜绿假单胞菌; 阴性对照组无菌生长。该方法能检出金黄色葡萄球、铜绿假单胞菌, 适合于该制剂

的控制菌检查。

4 讨论

药品的微生物限度检查结果受许多因素的影响,

在进行微生物检测时,只有在该检测条件下的样品浓度不足以抑制污染微生物的生长,才能使供试品中污染的微生物得以真实反映。因此,药品的微生物限度检查应通过验证试验证明所采用的方法是适宜的,方可使用<sup>[3]</sup>。中药制剂多为含有多种成分的复方制剂,同时生产中使用含抑菌作用的辅料以及加入抑菌剂或防腐剂等原因,影响微生物检查结果的因素更多,必须采取合适的试验方法去除制剂的抑菌作用,才能真实反映制剂受污染的程度<sup>[4]</sup>。

通常,对无抑菌作用的制剂可用常规法进行微生物限度检查,对抑菌作用较弱的制剂可通过稀释培养基来消除其抑菌作用。本文作者实际工作中对红藤消炎灌肠液进行微生物限度检查时,发现该制剂具有很强的抑菌活性,不能直接采用常规法或稀释培养基法。本文采用薄膜过滤法,去除其抑菌活性成分,进

行验证试验。为保证试验的科学性和准确性,本试验严格按照《中国药典》规定,选择5种菌株进行验证,结果表明,采用薄膜过滤法可有效消除红藤消炎灌肠液抑菌作用,各菌回收率均>70%,同时控制菌的检查方法能有效检出控制菌,该方法适合红藤消炎灌肠液的微生物限度检查。

## 参考文献

- [1] 马绪荣,苏德模.药品微生物学检验手册[M].北京:科学出版社.
- [2] 国家药典委员会.中国药典2010年版(二部)[M].北京:中国医药科技出版社,2010;附录XII,107.
- [3] 曹雄伟.最新药品微生物检验方法与操作标准规范及无菌隔离技术实用手册.上卷[S].北京:中国中医药出版社,2009:261.
- [4] 陈华龙,王莉蓓,谭莉萍.姜胆咳喘片微生物限度检查方法的验证[J].中国实验方剂学杂志,2010,(11):67.

## (上接第66页)

- [9] 陈英华,欧阳铁强.肾虚证动物模型规范化研究中诊断指标选择的初步探讨[J].中国中医基础医学杂志,2003,9(10):26-30.
- [10] 沈自尹.肾虚证的定位研究[J].中国中西医结合杂志,1997,17(1):50-52.
- [11] 张玲,刘治中,梁媛等.温阳解郁方对母婴分离/社会击败应激小鼠的影响[J].中国中医基础医学杂志,2010,16(7):563-566.
- [12] 张远怀,包祖晓,孙伟,等.益气温阳I号方治疗抑郁症的临床观察[J].福建中医药,2007,38(6):3-4.
- [13] 赵杰,彭涛,马艳苗.温阳解郁汤治疗抑郁症30例临床观察[J].山西中医,2011,27(7):15-16.
- [14] 贯春节.郝万山教授治疗精神抑郁症的思路与经验[J].光明中医.2001,16(94):94-95.
- [15] 赵杰.温阳法治疗抑郁症的探讨[J].世界中医药,2009,4(1):5-6.
- [16] 陈家旭,杨建新,赵歆,等.慢性束缚应激大鼠下丘脑 $\beta$ -内啡肽变化及中药复方对其的影响[J].中国医药学报,2004,19(2):83-85.
- [17] 岳广欣,黄启福,陈家旭.温阳解郁不同配伍组方抗抑郁效果观察[J].世界中西医结合杂志,2007(6):105-106.
- [18] 李建生,封银曼.补肾益神方治疗老年期抑郁症临床观察[J].河南中医药学刊,1994,9(1):41.
- [19] 谢磊,张鹏,罗瑞,等.基于“肾为元阳之本”探讨温补肾阳方治疗抑郁症[J].中华中医药杂志,2011,26(5):1130-1131.
- [20] 徐世芬,庄礼兴.电针百会、印堂为主治疗抑郁症疗效观察[J].上海针灸杂志,2010,29(9):569-572.
- [21] 李莉,姜佳丽.电针配合帕罗西汀治疗卒中后抑郁临床观察[J].甘肃中医学院学报,2011,28(1).
- [22] 李晓泓,韩橧,张露芬,等.艾灸“大椎”学抗应激作用的实验研究[J].中国行为医学科学,2002,11(5):495-496.
- [23] 刘瑶.灸百会治疗抑郁症250例的疗效观察[J].医药世界,2006(6):72-73.
- [24] 刘瑶,李玲,乔瑜,等.灸百会、膻中和松弛疗法对抑郁症患者血浆五羟色胺的影响[J].2009,36(3):446-447.
- [25] 刘运珠,刘布谷,罗有年,等.温针灸夹脊穴治疗抑郁症患者30例疗效观察及其脑电 $\alpha$ 波的影响[J].中医杂志,2008,49(11):995-997.
- [26] 王欣波.针刺治疗隐匿性抑郁症50例临床观察[J].中外医疗.2011(8):117.
- [27] 卓缘圆,皮敏.电针督脉和膀胱经对实验性抑郁症大鼠行为学及海马NSE表达的影响[J].中华中医药学刊,2012,30(4):833-835.
- [28] 裴音,张捷,陈杰,等.针刺王氏五脏俞治疗抑郁症临床观察[J].中国中医药信息杂志,2006,13(6):62-63.
- [29] 王晓燕.温针对抑郁性神经症血流变学及脑血流图的影响[J].贵阳中医学院学报,2005,27(4):28-29.