

Applicability Test of Anari-5 Powder Microbial Limit Test Method

Qiuxia Yan¹ Yan Sun² Yang Liu¹

1. Xinjiang Bortala Institute for Food and Drug Control, Bortala, Xinjiang, 833400, China
2. Department of Gastroenterology, Bortala People's Hospital, Bortala, Xinjiang, 833400, China

Abstract

Objective: To establish a microbial limit test method for the Mongolian medicine preparation Anazh-5. **Methods:** According to the "Chinese Pharmacopoeia" 2015 edition of the four non-sterile products microbiological limit inspection method: microbiological counting method (General Rule 1105) and non-sterile product microbial limit inspection: control bacteria inspection method (General Rule 1106) for applicability testing. **Results:** The recovery ratio of the five test bacteria of the test sample was between 0.1 and 2, and the control bacteria could be detected normally.

Keywords

Anari-5 powder; microbial limit; applicability test; recovery ratio

阿那日-5散微生物限度检查方法适用性试验

闫秋霞¹ 孙艳² 刘杨¹

1. 新疆博州食品药品检验所, 中国·新疆 博尔塔拉 833400
2. 博州人民医院消化内科, 中国·新疆 博尔塔拉 833400

摘要

目的: 建立蒙药制剂阿那日-5散的微生物限度检查方法。**方法:** 按《中国药典》2015年版四部非无菌产品微生物限度检查法: 微生物计数法(通则1105)和非无菌产品微生物限度检查: 控制菌检查法(通则1106)进行适用性试验。**结果:** 供试品5种试验菌回收比在0.1~2之间, 控制菌均能正常检出。

关键词

阿那日-5散; 微生物限度; 适用性试验; 回收比

1 引言

按《中国药典》2015年版四部规定, 进行微生物限度检查时必须进行适用性试验, 本文参考相关文献, 根据制剂中成分的抑菌作用强度不同, 采用了平皿法、建立了阿那日-5散相应的微生物限度检查方法, 经方法适用性试验证实该方法简便易行, 消除抑菌作用有效。

2 仪器与材料

2.1 仪器

PL602-L型电子天平(上海梅特勒-托利多仪器有限公司); YXQ-LS-50S II立式压力蒸汽灭菌器(上海博讯实业有限公司医疗设备厂); HC-1300 II A2生物安全柜(苏州安泰空气技术有限公司); DHP-B-9272B电热恒温培养箱(上

海一恒科学仪器有限公司); SPX-150生化培养箱(江苏扬州慧科电子有限公司)。

2.2 样品名称

阿那日-5散, 批号: 20180208、20181107、20190319。均由新疆维吾尔自治区博尔塔拉蒙古自治州博乐市蒙医院生产。

2.3 培养基及稀释液

胰酪大豆胨琼脂培养基	批号: 1704142
胰酪大豆胨液体培养基	批号: 1703082
沙氏葡萄糖琼脂培养基	批号: 150824
肠道菌增菌液体培养基	批号: 170216
紫红胆盐葡萄糖琼脂培养基	批号: 150818
麦康凯液体培养基	批号: 161228
麦康凯琼脂培养基	批号: 150907

RV 沙门增菌液体培养基 批号: 150912

木糖赖氨酸脱氧胆酸盐琼脂培养基 批号: 170621

以上培养基均由北京三药科技开发公司和青岛高科技工业园海博生物技术有限公司生产。按照 2015 年版药典要求进行配制、灭菌。

2.4 菌种

枯草芽孢杆菌 [CMCC(B)63501]

金黄色葡萄球菌 [CMCC(B)26003]

铜绿假单胞菌 [CMCC(B)10104]

白色念珠菌 [CMCC(F)98001]

黑曲霉菌 [CMCC(F)98003]

沙门氏菌 [CMCC(B)50094]

以上培养基和菌种均由中国食品药品检定研究院提供。

3 菌液及供试液制备

(1) 取经 35℃ 培养 18–24 小时的金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、枯草芽孢杆菌胰酪大豆胨液体培养物, 用 0.9% 无菌氯化钠溶液制成含菌数不大于 10000cfu/ml 的菌悬液;

(2) 取经 35℃ 培养 18–24 小时的大肠艾希氏菌、铜绿假单胞菌、沙门氏菌胰酪大豆胨液体培养物, 用 0.9% 无菌氯化钠溶液制成含菌数不大于 100cfu/ml 的菌悬液;

(3) 取经 25℃ 培养 2–3 天的白色念珠菌沙氏葡萄糖液体培养物, 用 0.9% 无菌氯化钠溶液制成含菌数不大于 10000cfu/ml 的菌悬液;

(4) 取经 25℃ 培养 5–7 天黑曲霉的新鲜培养物加入 3 ~ 5ml 含 0.05% (ml/ml) 聚山梨酯 80 的 0.9% 无菌氯化钠溶液, 将孢子洗脱, 用含 0.05% (ml/ml) 聚山梨酯 80 的 0.9% 无菌氯化钠溶液制成含菌数不大于 10000cfu/ml 的孢子悬液;

(5) 供试液制备: 取样品 10g, 加 pH7.0 无菌氯化钠 – 蛋白胨缓冲液至 100ml, 混匀, 制成 1: 10 的供试液; 取 1: 10 的供试液 10ml, 加 pH7.0 无菌氯化钠 – 蛋白胨缓冲液至 50ml, 制成 1: 50 的供试液; 取 1: 10 的供试液 10ml, 加 pH7.0 无菌氯化钠 – 蛋白胨缓冲液至 100ml, 制成 1: 100 的供试液

4 需氧菌总数和霉菌及酵母菌总数计数检查方法适用性

供试液分别加入上述 5 种代表性实验菌株, 再加 15–

20ml 规定的琼脂培养基待凝固后, 置规定温度培养 24–72 小时, 观察结果, 平板计数, 测定回收比值。^[1]

4.1 回收比值测定

4.1.1 试验组

取上述 1:10、1:50、1:100 供试液 10ml 加入 0.1ml 试验菌, 混匀, 取含菌供试液 1ml 分别注入无菌平皿中, 立即相应的琼脂培养基, 每株试验菌平行制备 2 个平皿, 按平皿法测定其菌数。需氧菌总数计数的试验菌株为金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、枯草芽孢杆菌, 相应的琼脂培养基为胰酪大豆胨琼脂培养基; 霉菌和酵母菌总数计数的试验菌株为沙氏葡萄糖琼脂培养基。

4.1.2 供试品对照组

取制备好的供试液, 不加菌液, 按试验组计数方法, 测定供试品本底菌数。

4.1.3 菌液对照组

取 pH7.0 无菌氯化钠 – 蛋白胨缓冲液替代供试液, 按试验组操作加入试验菌液并进行测定其菌数。^[2]

4.1.4 回收率结果计算公式

比值 = (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

表 1 1:10 (计数单位 cfu)

阳性菌	次数	试验组			菌液组			供试品对照组			比值
		1	2	平均	1	2	平均	1	2	平均	
枯草芽孢杆菌	1	7	2	4.5	68	65	66.5	0	0	0	0.07
金黄色葡萄球菌	1	0	3	1.5	53	55	54	0	0	0	0.03
铜绿假单胞菌	1	18	13	15.5	98	94	96	0	0	0	0.16
白色念珠菌	1	21	23	22	48	56	52	0	0	0	0.42
黑曲霉菌	1	47	46	46.5	56	61	58.5	0	0	0	0.79
	2	43	54	48.5	63	52	57.5	0	0	0	0.84
	3	50	42	46	48	54	51	0	0	0	0.9

表 2 1:50 (计数单位 cfu)

阳性菌	次数	试验组			菌液组			供试品对照组			比值
		1	2	平均	1	2	平均	1	2	平均	
枯草芽孢杆菌	1	18	24	21	68	65	66.5	0	0	0	0.32
金黄色葡萄球菌	1	17	11	14	53	55	54	0	0	0	0.26

铜绿假单胞菌	1	80	86	83	98	94	96	0	0	0	0.86
	2	74	76	75	91	96	93.5	0	0	0	0.8
	3	73	71	72	83	85	84	0	0	0	0.86
白色念珠菌	1	47	46	46.5	48	56	52	0	0	0	0.89
	2	50	54	52	65	63	64	0	0	0	0.81
	3	61	58	59.5	51	59	55	0	0	0	1.08

表3 1:100 (计数单位 cfu)

阳性菌	次数	试验组			菌液组			供试品对照组			比值
		1	2	平均	1	2	平均	1	2	平均	
枯草芽孢杆菌	1	67	66		68	65		0	0	0	
	2	70	54		69	59		0	0	0	
	3	57	58		66	71		0	0	0	
金黄色葡萄球菌	1	50	41	66.5	53	55	66.5	0	0	0	1
	2	51	58	62	56	59	64	0	0	0	0.97
	3	52	55	57.5	60	62	68.5	0	0	0	0.84

从表1、表2、表3结果显示：用1:10的供试品按平皿法对枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、白色念珠菌有明显抑制作用，1:50的供试品对枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌有明显抑制作用，回收比值小于0.5，采用1:100的供试品按平皿法对规定的菌株无明显抑制作用，回收比值在0.5~2之间，该供试品需氧菌总数计数可采用1:100供试液按平皿法测定，霉菌及酵母菌总数计数可采用1:50供试液按平皿法测定。

4.2 控制菌检查方法适用性

4.2.1 菌液的制备

同计数方法适用性试验，控制菌菌液计数如下：

表4 控制菌菌液计数 (计数单位: cfu)

试验菌	大肠艾希氏菌	沙门氏菌	铜绿假单胞菌
1	69	71	59
2	62	78	61
平均	65.5	74.5	60

4.2.2 适用性试验

(1) 大肠艾希氏菌

取1:10的供试液10ml，加入大肠埃希菌菌液1ml，加入100ml胰酪大豆胨液体培养基，混匀，置35℃培养18小时，取上述培养物1ml接种至100ml麦康凯液体培养基中，42℃培养24小时。取麦康凯液体培养物划线接种于麦康凯琼脂培养基平板上35℃培养18小时，麦康凯琼脂培养基应能检出大肠艾希氏菌反应特征。

表5 大肠埃希菌检查方法验证结果表

	胰酪大豆胨液体培养基	麦康凯液体培养基	麦康凯琼脂培养基
实验组	+	+	+
供试品组	-	-	-
阳性对照	+	+	+
阴性对照	-	-	-

(2) 耐胆盐革兰阴性菌

取样品1:10供试液100ml，置25℃培养2小时，取上述培养物10ml，加大肠埃希菌菌液、铜绿假单胞菌菌液各1ml，摇匀，接种至100ml肠道菌增菌液体培养基中，35℃培养24小时后，分别划线接种于紫红胆盐葡萄糖琼脂平板上，35℃培养18小时，紫红胆盐葡萄糖琼脂平板上应能检出耐胆盐革兰阴性菌的反应特征。

表6 耐胆盐革兰阴性菌检查方法验证结果表

	胰酪大豆胨液体培养基	肠道菌增菌液体培养基	紫红胆盐葡萄糖琼脂
实验组	+	+	+
供试品组	-	-	-
阳性对照	+	+	+
阴性对照	-	-	-

上述结果表明，本品的控制菌检查方法为：大肠艾希氏菌，取样品1:10供试液10ml接种至胰酪大豆胨液体培养基中，培养基用量100ml；耐胆盐革兰阴性菌，取25℃培养2小时样品1:10供试液10ml，接种至肠道菌增菌液体培养基，培养基用量100ml。

5 结语

本品按《中国药典》2015年版四部微生物限度检查1105、1106的方法进行三次独立适用性试验，方法取样品10g，加pH7.0无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液至100ml，制成1:50，1:100的供试液，需氧菌总数计数可采用1:100供试液按平皿法测定，霉菌及酵母菌总数计数均可采用1:50供试液按平皿法测定；控制菌检查按照控制菌检查供试品制备方法和控制菌检查方法适用性试验进行检查。

参考文献

- [1] 中国药典四部[S]2015;通则(1105、1106)
- [2] 李趣嫦,江艳芳.《中国药典》2010版与2015版微生物限度检查法对四种药物检测结果的比较[J]中国药品标准.2015,16(2):86-90.