

## 8C=HDND?F 测试片法在药品微生物检验中的应用研究

王鲁华,刘婷婷,卢京光,孙振平

(青岛市药品检验所,青岛 266033)

**摘要** 目的:讨论 8C=HDND?F 测试片在药品微生物检查中的应用%方法:通过人工接种试验菌株,比较平皿法和 8C=HDND?F 测试片法在 10 个药品品种微生物检验中的应用%结果:平皿法与 8C=HDND?F 测试片法用于药品检验,结果无显著性差异%结论:8C=HDND?F 测试片法操作简单方便,可以用于某些药品品种的微生物检查%

**关键词** 药品检测;微生物检测;工作菌株;平皿法;8C=HDND?F 测试片法;计数法

中图分类号:R917.1 文献标识码:A 文章编号:1001-8262(2012)12-035-03

8C=HDND?F 测试片法在药品微生物检验中的应用研究

王鲁华,刘婷婷,卢京光,孙振平

(青岛市药品检验所,青岛 266033)

目的:讨论 8C=HDND?F 测试片在药品微生物检查中的应用%方法:通过人工接种试验菌株,比较平皿法和 8C=HDND?F 测试片法在 10 个药品品种微生物检验中的应用%结果:平皿法与 8C=HDND?F 测试片法用于药品检验,结果无显著性差异%结论:8C=HDND?F 测试片法操作简单方便,可以用于某些药品品种的微生物检查%

**关键词** 药品检测;微生物检测;工作菌株;平皿法;8C=HDND?F 测试片法;计数法

中图分类号:R917.1 文献标识码:A 文章编号:1001-8262(2012)12-035-03

各国药典规定药品微生物限度检查多采用平皿法和薄膜法<sup>[1]</sup>,其中平皿法应用较多,但是在实际检测中某些药品品种前处理样品浊度或颗粒较大,不借助 8C=HDND?F 等试剂难以计数%8C=HDND?F 测试片法是一种新的计数方法,在化妆品和食品检验中已经有所应用<sup>[2]</sup>,该方法曾被收录为《GB 4789.10-2010 食品微生物学检验菌落总数测定第二法》<sup>[3]</sup>。国内有些学者开始探索测试片法在药品检验中的应用<sup>[4]</sup>。本文通过人工接种工作菌株,对 10 个药品品种采用 8C=HDND?F 测试片法与平皿法进行微生物限度检查,结果表明 2 种方法无显著性差异%8C=HDND?F 测试片法简单快捷,经济实用,操作方便,特别适合快速检验%。

#### 1 试验材料

1.1 号复方硫洗剂(规格 100g);1.2 号奥氮平(规格 100g);1.3 号复方营养混悬剂(规格 100g);1.4 号硫酸钡(Ⅱ型)干混悬剂;1.5 号硫酸钡(Ⅰ型)干混悬剂;1.6

号硫酸镁溶液(规格 100ml);1.7 号硫酸镁溶液(规格 33ml);1.8 号复方醋酸地塞米松乳膏(规格 100g);1.9 号小儿消积止咳口服液(规格 100ml);1.10 号小儿盐酸氯丙嗪糖浆((1.11 号氧化锌软膏(规格 30g);1.12 号防风通圣颗粒(规格 30g);1.13 号舒乐洗剂(规格 100ml);1.14 号上感康颗粒;1.15 号爽咽合剂;1.16 号明胶空心胶囊(规格 100粒);1.17 号银杏叶片;1.18 号穿虎痛风口服液;1.19 号银黄颗粒(规格 100g);1.20 号复方苯甲酸软膏(规格 100g)。

营养琼脂培养基(批号:1.21),营养肉汤培养基(批号:1.22),玫瑰红钠琼脂培养基(批号:1.23),1.24 号氯化钠蛋白胨缓冲液(批号:1.25)以上培养基的促生长能力、抑制能力及指示能力检查,回收率等均符合要求%。

8C=HDND?F 菌落总数测试片 8C=HDND?F 霉菌及酵母菌总数测试片:1.26,产地美国%。

大肠埃希菌(=0157:H7) 1.27 [1.28% (1.28)]

第一作者 王鲁华(33331)E-mail: wluhua@163.com

""(\$): 金黄色葡萄球菌 (<-61\$#0"00\*2 -')\*2)  
 [%4%(% (8) \*11\$3\$]; 枯草芽孢杆菌 ( I-0\*##' 20\*4,\*M  
 #2 [%4%(% (8) 13#\$( ); 白色念珠菌 ( C-&0#\* -#4\*M  
 0-&2 [%4%(% (Y) )-\$\$( )\*\* 以上菌种由中国食品药  
 品检定研究院提供, 实验选用第三代菌种%

方法 [2] #V]

2# 菌液制备

2# 取经 3# K 培养 \*' I 的金黄色葡萄球菌, 枯  
 草芽孢杆菌, 大肠埃希菌培养物 ( G2 加 ) G2 生理  
 盐水 (\$ 倍稀释至 (\$ 0\* H(\$ 07 之间备用%

2# 取经 \*- K 培养 \*- I 的白色念珠菌培养物 ( G2 加 ) G2 生理盐水 (\$ 倍稀释至 (\$ 0" H(\$ 0# 之间  
 备用%

2" 工作菌株计数

2"2# 平皿法 分别取合适浓度的上述 3 种细菌  
 菌液 (# \$ H(\$ \$ LEV), 加入培养皿, 注入营养琼脂 (#  
 H\*\$ G2, 放置 3# K 培养 \* S; 取上述白色念珠菌菌  
 液 (# \$ H(\$ \$ LEV), 加入培养皿, 注入玫瑰红钠琼脂

培养基 (# H\*\$ G2, 放置 \*- K 培养 3 S%

2"2" 取同平皿法同样量的菌液加入测试片中 [7],  
 并与平皿法置于同样的温度培养相同时间%

2"! 供试液制备 取样品 (\$ 0( G2), 加入 !- 7^ \$  
 氯化钠蛋白胨缓冲溶液至体积为 (\$ \$ G2%

2"U 加菌供试液计数

2"UZ# 平皿法 加入同""\*^ ( C 同样的工作菌液  
 的量, 同时加入经验证无抑菌作用的适量的供试液  
 到培养皿中, 注入培养基, 培养%

2"UZ" !ABCEDFG 测试片法 加入同""\*^ ( C 同样的  
 菌液和供试液到测试片上, 并与平皿法置于同样的  
 温度培养相同时间%

2"1 阴性对照 方法同上加入 ; - 7^ \$ 氯化钠蛋白  
 胨缓冲溶液, 应无菌生长%

! 结果

!2# 平皿法与 !ABCEDFG 测试片法细菌及酵母菌计  
 数比较实验 结果见表 (%

表# 平皿法与 8C-HMD?F 测试片法计数结果  
 :EJ # 6CLA?L ;V JEI=CHDE? I ;A<=L J@ KC=H BDL> E<B KC=HMD?F KEKCH BDL\_ FC>>;BL

样品 (UMG;FA)	菌落总数 (LEV)							
	大肠埃希菌(=0"?)		枯草芽孢杆菌(I; 20*4,*2)		金黄色葡萄球菌(<-')*2)		白色念珠菌(C>-#4*0-82)	
	平皿 (;ABCSOU)	纸片 (;N;AC)	平皿 (;ABCSOU)	纸片 (;N;AC)	平皿 (;ABCSOU)	纸片 (;N;AC)	平皿 (;ABCSOU)	纸片 (;N;AC)
(	(((\$	(\$)	#1	#(	"#	#\$	"\$	*(
*	(((\$	(\$)	#3	"7	"(	"7	*(	*(
3	(((\$	(\$)	#"	#\$	"\$	"#	"\$	*(
"	(\$)	(((\$	#(	"")	"#	#(	**	*(
#	(\$)	(\$)	#1	#\$	3-	"#	"\$	()
1	(((\$	(\$-	#(	"1	"#	#\$	**	*(
7	(\$\$	(\$	##	#(	37	**	()	"\$
-	(((\$	((	#"	#\$	3)	"\$	"\$	"\$
)	(\$)	(((\$	#"	#(	"3	"#	*(	*(
(\$	(("	(((\$	#3	"")	"7	#(	**	*(
((	(((\$	(("	#"	#\$	"")	#\$	"\$	"\$
('	(("	((	##	#\$	"-	#(	*(	"\$
(3	(\$\$	)	#"	"-	"7	"")	**	*(
("	(((\$	(\$)	#1	#\$	"1	#\$	"\$	*(
(#	((#	(("	#"	"")	"#	"-	"\$	**
(1	((1	(("	#1	#(	"1	"")	"\$	*(
(7	((#	(("	#"	#\$	""	#\$	"\$	*(
(-	(((\$	(((\$	#(	#\$	"#	"")	**	*(
()	((()	(\$\$	##	"")	"3	"#	**	**
*\$	(("	(("	#'	"-	"1	"")	"\$	*(
阳性对照( ;NUSbA UN-30F)	(("	((7	#1	#\$	"7	#(	**	*(
阴性对照( >ADMBa UN-30F)	\$	\$	\$	\$	\$	\$	\$	\$

注( >NBA) : (X 样品经处理本底菌数均为 \$ ( GCLN,DF FABAFU NE UNG;FAU JACA ARGb-NBASI) : \*I 以上数据均为平行试验平均值 ( CAUNFU NE BBU BU,FA JACA NBAGQAS ,P ;MOMFAF  
 BAUBU)

1.2 平皿法与 ABCDEFG 测试片法对照图 见图 1-3



图 1 大肠埃希菌  
Y00 ( =2017)01- 012



图 2 枯草芽孢杆菌  
Y00 1-012 2014, 112

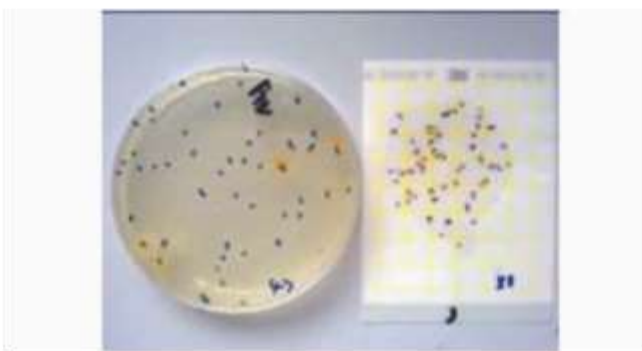


图 3 金黄色葡萄球菌  
Y00 3 <, -61210002 -) +2

U 结论

欧洲药典、美国药典及中国药典 2015 年版中都收录了微生物检验替代方法验证的指导原则。各检验机构可以根据自身条件和产品特点选用其它非药典收录的方法替代药典方法进行药品检验,使用前必须在有产品存在的情况下进行方法验证,以证实该方法等同于或优于药典规定的检验方法。本文通过在 20 种药品品种中加入 10 种菌液进行回收比较,证明平皿法与 ABCDEFG 测试片法回收率未有显著性

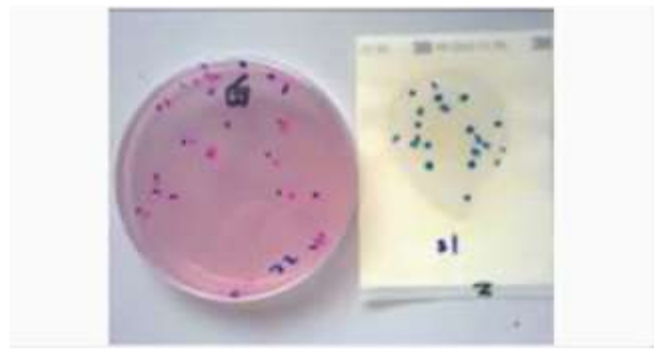


图 4 白色念珠菌  
Y00 C-801 -140-82

差异,检验了该方法的灵敏度与传统平皿计数法检测结果的一致性,结果满意。该结果表明 ABCDEFG 测试片法对某些药品品种的微生物限度检测具有实际的意义。ABCDEFG 测试片法细菌检测结果显示紫色,酵母菌显示蓝绿色,对某些应用平皿法不易计数的混悬剂、试液有沉淀、粘稠度大等药品品种不需再加试剂来区别渣滓和细菌,大大简化了微生物限度检查操作,减少了工作量。和传统的方法相比较,它能缩短测试时间,操作程序更加简便,不需要很高的操作技巧,有助于提高微生物实验质量和提高实验室效率,使计数更方便准确。希望本文能够为检验工作者提供了一定的技术参考资料。

参考文献

1. 中国药典 2015 年版二部附录 X 微生物限度检查法  
2. 中国药典 2015 年版二部附录 X 微生物限度检查法  
3. 中国药典 2015 年版二部附录 X 微生物限度检查法  
4. 中国药典 2015 年版二部附录 X 微生物限度检查法  
5. 中国药典 2015 年版二部附录 X 微生物限度检查法  
6. 中国药典 2015 年版二部附录 X 微生物限度检查法  
7. 中国药典 2015 年版二部附录 X 微生物限度检查法  
8. 中国药典 2015 年版二部附录 X 微生物限度检查法  
9. 中国药典 2015 年版二部附录 X 微生物限度检查法  
10. 中国药典 2015 年版二部附录 X 微生物限度检查法

(下转第 831 页)

采收期和产地加工方法不当等也是影响内在质量的主要因素,这些因素会导致药材有效成分先天不足;再次,药材有效成分的积累与生长环境有直接或间接影响<sup>[1]</sup>

! "# 应有效利用大黄水根 ! 实验表明,大黄主根所含蒽醌成分高于支根,说明主根质量优于支根,但不能因为支根质量差而弃去不用,这样不仅浪费有限的中药资源,而且会给药农造成一定的经济损失 ! 实际上水根作为商品规格在市场上大量销售 ! 为了进一步有效利用水根,建议做进一步研究 !

! "\$ 实验时首先采用药典方法,在流速 1.0 mL/min,检测波长 254 nm 条件下进行测定,结果分离效果不理想 ! 而选用文献 [12] 方法,流动相和柱温不变,在流速 1.0 mL/min,检测波长 254 nm 条件下色谱峰分离情况理想 !

参考文献

1. 中国药典. 一部. 2015. 234. (一部) : \*\*

2. 56(78 093) : ('64 <89=68 3> 7864'9A 6(B 0=;/('64 78C=9:7'3( (甘肃省质量技术监督局) : 83;64 796(B69B 3> 56(78 093) : (= (甘肃省地方标准) : D< E\*FG) \*\$\$\* 03448'3( ) >9= . / (=7= / =9H64 %B'; (= 1/8H69H C93B8; 3( 0=;/ (343JA( 无公害中药材大黄生产技术)

3. KLMN5 .8( (张村), &0 &' (李丽), P0MQ R3(J) ?'(J( 肖永庆), !' #1 L0&. 7%846(=387 B=9%'(6'3( 3> 6(9/9678' (3(=) %) J48;37'B=7 '( B'>=9=(9 H395('; 64 39'J'(7 3> 9/8H69H( L0&. 法同时测定大黄不同来源药材中 \* 个蒽醌苷类成分的含量) ! &'( ) \* +\*#,- .) # ( 药物分析杂志), \*\$\$\$. -(X) : "E-E

4. 5MQ P'63 ) A6( (高晓燕), &T U'6( ) ?'8( 卢建秋), L0&. ) DMD 7%846(=387 B=9%'(6'3( 3> V 6(9/9678' (3(= B=9':6' : =7 '( 9/8W

H69H( L0&. ) DMD 法同时测定大黄中 V 个蒽醌类化合物的含量) ! &'( ) \* +\*#,- .) # ( 药物分析杂志), \*\$\$\$. -(X) : "E-E

5. 80 &=\*( 李磊), YTN 0'(J( 孙平), Z[N5 . /=(J) ?'6(J( 冯成强) ! .3%089'73( 3> 0/= ;3(0=(87 3> 6(9/9678' (3(=7 H=9S==( ;84' :6)=B 6(B S'4B /'10- 1#5-#0-( 不同产地野生与栽培掌叶大黄中蒽醌类成分含量的比较) ! 2(3'(4'1) 516 5#1, 516 /13( 时珍国医国药), \*\$\$\$. \*\* (X) : \*\*!"

6. 80N 18' ) %'( (林瑞民), &0 &=\*( 李磊), .L[N L86 ) 7/6( (陈华山), !' #1 L0&. B=9%'(6'3( 3> 6(9/9678' (3(= B=9':6' : =7 3> 1/8W H69H '( B'>=9=(9 7C=; '=7 6(B 69=67( 不同品种不同产地大黄中五种蒽醌类化合物的 L0&. 测定) ! \* &'( ) 516 5#1, ( 中药材), \*\$\$\$. \*, (-) : "XV

7. L[ R'(J) %=( (何英梅), L[ U8( ) ?86( (贺军权), \M P'63( 马藩), !' #1 G/ = ;3%09= /=(7' : = 7864'9A '(7C=; 3( '( B'>=9=(9 ;3%W %>9; '64 7C=; '> ;6'3( 3> 1/8H69H >93% 56(78( 不同商品规格的甘肃大黄的综合素质考察) ! &'( ) # +\*#,- ( 中国药事), \*\$\$\$. \*\$ ('\$) : E\*\*

8. L[ U8( ) ?86( (贺军权), QTRMNS P'63 ) %=( (欧阳晓玫), KLTN U8( ) 98( 朱俊儒) ! G/ = ;3%09= /=(7' : = 7864'9A '(7C=; 3( 3> 1/8H69H '( B'>=9=(9 C93B8; '(J 69=67 >93% 56(78( 甘肃不同产区大黄药材的综合素质考察) ! &'( ) 7, #6( +# 516( 中成药), \*\$\$\$. \*X( ) : , ,

9. 80 R8( (李芸), \0MQ P'63 ) 438( 苗小楼), &0 R8= ) >=(J( 李越峰), !' #1 Y88BA 3( 0/= 7864'9A '=7 '( B'>=9=(9 69=6 C93; =77=B C93BW 8; 8' 3> 1/8H69H( 大黄不同产地加工品质研究) ! \* 7, #6( &'( ) 8! 516( 中兽医医药杂志), \*\$\$\$. ( ) : ++

10. 80 R8( (李芸), \0MQ P'63 ) 438( 苗小楼), ] 8 0'(J) 6( (吴平安), !' #1 0(>48( ; =7 3> B'>=9=(9 '(9'64 C93; =77'(J %>9/387 3( /'10- +#5-#0-( 不同产地加工方法对掌叶大黄药材质量的影响) ! \* &'( ) 516 5#1, ( 中药材), \*\$\$\$. -( , ) : "XE ( 本文于 \*\$\$\$ 年 "\$ 月 + 日修改回)

(上接第 \*\*EX 页)

X \M R8=( 马越), G[ R8 ) ^'6(J( 特玉香), DT 0'(J) /86( 杜平华), !' #1 264'B6'3( %>9/3B 87=B >39 %'; 93H'64 4%'7 3> "E \_'(87 3> 96B'3(64 . / (=7= %B'; (= ("E 种中成药微生物限度检查法方法验证) ! 9, 0: ; \*#) 6 &'( ) # ( 中国药品标准), \*\$\$\$. E(E) : " "

11. RT L3(J( 俞虹), &0N5 \'(J( 凌明), R0N5 U'6( 应佳), !' #1 \=9/3B 6(B :64'B6'3( 3> 0/= %'; 93H'64 4%'7 3> 6(9'78=7 3> 6(9'7W H6; 9'64 6; 3' : 'A( 具抗菌活性胶囊剂的微生物限度检查方法及验证) ! &'( ) \* +\*#,- .) # ( 药物分析杂志), \*\$\$\$. \*E(X) : "-\*, ( 本文于 \*\$\$\$ 年 - 月 "X 日收到)