

三组痰咳净同名异型制剂微生物限度检查方法研究

岳颖*

(天士力医药集团股份有限公司, 天津 300400)

摘要:目的 通过微生物适用性试验,建立三组痰咳净同名异型制剂微生物限度检查方法。**方法** 按照2020年版《中华人民共和国药典》四部通则1105、1106要求研究微生物计数及控制菌检查方法。**结果** 采用常规法、稀释法、薄膜过滤法、中和法进行方法适用性试验,微生物计数各试验菌回收率均在50%~200%范围内,控制菌检查均能检出阳性菌。**结论** 所建立的方法符合药典要求,可作为3组制剂的微生物限度检查方法。

关键词: 痰咳净;同名异型;微生物限度检查;方法适用性

0 引言

痰咳净是由桔梗、远志、苦杏仁、甘草、五倍子、冰片和咖啡因等组成的中西药复方制剂,具有通窍顺气、消炎镇咳祛痰之功效^[1]。本研究选取3组不同企业所产同名异型痰咳净制剂,分别为滴丸剂、片剂、散剂,辅料及工艺均有不同,虽原药材、功能主治一致,但疗效不同^[2]。由于中药材品种繁多,性质差别悬殊,临床要求不同,药材所含成份之间相互作用关系复杂等原因,必须将药材制成各种不同剂型才能更好地满足临床用药的需要^[3]。口服制剂中微生物污染状况的控制是药品质量控制的重要指标,而中药口服制剂因药材来源及生产工艺的特殊性,尤其易受到微生物的污染^[4],因此在试验前对样品组分抑菌性及试验菌的敏感度进行分析以确定预试验菌株:根据以往经验,枯草芽孢杆菌对多数药物均比较敏感^[5];对控制菌检查法从是否含药材原粉方面来开展研究^[6],再根据给药途径确定检验项目,基于2020年版《中华人民共和国药典》四部通则1105、1106项下要求^[7],结合样品本身特性逐步完成预实验、正式试验,确保方法的适用性及可行性。本研究从常规法入手,逐步进行稀释法、薄膜过滤法、中和法,建立了3组同名异型痰咳净制剂微生物限度检查方法。

1 材料与方法

1.1 仪器

T500Y型电子天平(常熟双杰);1300系列生物安全柜(Thermo);Milliflex型薄膜过滤器(Merck);KB400型

微生物培养箱(Binder);Vitek 2型全自动微生物鉴定系统(bioMérieux)。

1.2 试药、培养基和菌种

痰咳净滴丸(批号:230309,天津天士力医药集团股份有限公司);痰咳净片(批号:20221216,吉林白山正茂药业股份有限公司);痰咳净散(批号:2301003,广州王老吉药业股份有限公司)。

胰酪大豆胨琼脂培养基,沙氏葡萄糖琼脂培养基,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,含3%吐温80和0.3%卵磷脂的胰酪大豆胨液体培养基,沙氏葡萄糖液体培养基,RV沙门菌增菌液培养基,木糖赖氨酸脱氧胆酸盐琼脂培养基,肠道菌增菌液培养基,紫红胆盐葡萄糖琼脂培养基。pH 7.0无菌氯化钠蛋白胨缓冲液(稀释液)。适用性均符合2020年版《中华人民共和国药典》四部相关要求。

铜绿假单胞菌[CMCC(B)10104]、金黄色葡萄球菌[CMCC(B)26003]、枯草芽孢杆菌[CMCC(B)63501]、白色念珠菌[CMCC(F)98001]、黑曲霉[CMCC(F)98003]、大肠埃希菌[CMCC(B)44102],乙型副伤寒沙门菌[CMCC(B)50094]均来源于中国食品药品检定研究院,本试验所用试验菌均为第4代。

1.3 方法

1.3.1 菌液制备

铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌,于100 mL胰蛋白大豆肉汤培养基(TSB)中33℃培养18~24 h;白色念珠菌,于100 mL沙氏葡萄糖液体培养基(SDB)中23℃培养48~72 h;黑曲霉,转接于沙氏葡萄糖

* 通信作者:岳颖,副高级工程师,研究方向为药品、原辅料及包材微生物限度检查方法研究与菌株分离鉴定。E-mail: jgzazr@sina.com

琼脂培养基(SDA)斜面上, 23 °C 培养 5~7 d, 于新鲜斜面培养物加入 3~5 mL 含 0.05% 聚山梨酯 80 的 pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液将孢子洗脱, 采用吸管头部加脱脂棉的方法吸出孢子悬液至无菌试管。以上菌液稀释至适宜浓度菌悬液, 在规定温度和时间内使用。

1.3.2 供试液制备

称取样品 10 g 加入 90 mL 稀释液中, 制备 1:10 供试液; 吸取 1:10 供试液 1 mL 至 9 mL 稀释液中, 制备 1:100 供试液。

1.3.3 微生物计数法

方法: 供试品试验组。①平皿法: 取试验菌 0.1 mL 加入 9.9 mL 1:10 供试液中, 取 1 mL 至无菌空平皿加入溶化的培养基。②薄膜过滤法^[8]: 1:10、1:100 供试液 1 mL, 冲洗 200 mL, 最后一次抽滤时加入试验菌液, 滤膜贴于培养基平板。③培养: 胰酪胨大豆琼脂培养基(TSA)于 33 °C 培养 3 d; SDA 于 23 °C 培养 5 d。

标准: 所有试验菌 3 次试验回收率须均在 50%~200% 范围内。回收率(%)=(供试品试验组平均菌落数-供试品对照组平均菌落数)/试验菌液组平均菌落数 × 100%。

1.3.4 控制菌检查

方法: 供试品试验组。①大肠埃希菌常规法: 1:10 供试液加至适量 TSB, 加入不大于 100 CFU 的大肠埃希菌试验菌液, 33 °C 培养 18 h; 取培养液 1 mL 加入 100 mL 麦康凯液体培养基(MaCB)中, 43 °C 培养 24 h; 取培养物划线接种于麦康凯琼脂培养基(MaCA)平板上, 33 °C 培养 18 h。②沙门菌常规法: 供试品 10 g 加至适量 TSB。中和剂法: 供试品 10 g 加至适量含 3% 吐温 80 和 0.3% 卵磷脂的 TSB^[9]。薄膜过滤法: 供试品 10 g 加

至 100 mL TSB, 溶解后薄膜过滤法 10 mL × 10 膜, 滤膜全部加至适量 TSB。加入不大于 100 CFU 的乙型副伤寒沙门菌试验菌液, 33 °C 培养 18 h; 取培养液 0.1 mL 加入 10 mL 沙门菌增菌液体培养基(RV)中, 33 °C 培养 18 h; 取培养物划线接种于木糖赖氨酸脱氧胆酸盐琼脂(XLD)平板上, 33 °C 培养 18 h。③耐胆盐革兰氏阴性菌取预增菌后 1:10、1:100、1:1000 供试液 1 mL 各 2 组于适量肠道菌增菌肉汤(EE)培养基, 分别加入不大于 100 CFU 的大肠埃希菌、铜绿假单胞菌试验菌液, 33 °C 培养 24 h; 取培养物划线接种于紫红胆盐葡萄糖琼脂(VRBGA)平板上, 33 °C 培养 18 h。

标准: 3 次试验供试品试验组均出现典型菌落, 大肠埃希菌检查、沙门菌检查中鉴定结果为相应控制菌。

2 结果与分析

2.1 结果

2.1.1 微生物计数法

由表 1 可见, 3 组样品需氧菌总数检查均采用薄膜过滤法, 痰咳净滴丸 1:10 供试液 1 mL, 冲洗 200 mL, 痰咳净片与痰咳净散 1:100 供试液 0.2 mL × 5 膜, 各冲洗 200 mL; 霉菌和酵母菌总数检查痰咳净滴丸 1:10 供试液 1 mL, 薄膜过滤法, 冲洗 200 mL, 痰咳净片与痰咳净散 1:10 供试液 1 mL, 平皿法 5 皿法, 3 次试验所有试验菌回收率均符合要求, 方法通过确认。

2.1.2 控制菌检查

由表 2 可见, 3 组痰咳净制剂所筛选出的方法 3 次试验供试品试验组均出现典型菌落, 鉴定结果为大肠埃希菌、沙门菌属, 方法通过确认。

表 1 微生物计数法适用性回收率(%)

试验菌	需氧菌总数检查									霉菌和酵母菌总数检查									
	痰咳净滴丸			痰咳净片			痰咳净散			痰咳净滴丸			痰咳净片			痰咳净散			
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
S	94	93	88	74	82	77	73	80	74										
P	87	96	91	84	80	85	79	82	75										
B	90	79	89	66	70	62	81	76	73										
C	115	100	102	83	88	86	106	102	98	94	99	108	76	70	79	104	99	101	
A	88	87	96	108	101	105	113	106	110	98	95	87	100	92	97	115	118	104	

2.2 分析

通过试验发现 3 组痰咳净制剂均具有较强抑菌性, 微生物计数法分别采用了平皿法 5 皿法、薄膜过滤法, 平皿法是非无菌制剂微生物计数的最传统方法, 薄膜过滤法为

使用冲洗液将抑菌成分过滤去除, 以确保得到较准确的检测结果^[10], 还具有取样量大、定量限更低的优点, 痰咳净片、痰咳净散采用了高稀释级薄膜过滤法以降低抑菌作用, 但定量限相对较高致准确性稍差。沙门菌检查中痰咳

净滴丸为包衣丸，1：10 供试液无法通过滤膜^[11]，因此考虑采用中和剂法，吐温 80 和卵磷脂有中和作用，依据试验结果可见 3% 吐温 80 和 0.3% 卵磷脂有利于微生物的检

出，但对试验菌株生长没有影响，可有效解决样品中抑菌性的去除和供试液中大量极细粉及不溶性物质使微孔滤膜阻塞，从而导致过滤速度极慢甚至不能过滤的问题。

表 2 控制菌检查方法适用性试验结果(供试品试验组)

样品	大肠埃希菌				方法	沙门菌				耐胆盐革兰氏阴性菌										
	TSB 量	MaCA				鉴定结果	增菌培养基量	XLD			XLD 鉴定结果	EE 量	试验菌	VRBGA						
		1	2	3				1	2	3				1	2	3				
痰咳净滴丸	200	+	+	+	大肠埃希菌	中和剂法	700	+	+	+	沙门菌属	10	E	+	+	+	P	+	+	+
痰咳净片	300	+	+	+	大肠埃希菌	薄膜过滤法 (10 mL×10 膜)	300	+	+	+	沙门菌属	10	E	+	+	+	P	+	+	+
痰咳净散	300	+	+	+	大肠埃希菌	薄膜过滤法 (10 mL×10 膜)	300	+	+	+	沙门菌属	100	E	+	+	+	P	+	+	+

3 讨论与结论

方法适用性试验的本质是建立对样品影响更小，操作效率更高的方法^[12]，去除药品抑菌性是其中的重点和难点^[13]。由于临床要求不同等原因，需将药材制成不同剂型以满足用药需要^[14]，但原料药材与辅料、生产工艺会有所差异，最终导致抑菌活性的区别，对制剂微生物限度检查方法有可能产生重要影响^[15]。因此对于同名异型中药制剂在进行微生物限度检查时，不可沿用一种方法，必须逐一进行方法适用性试验，以找到适合该产品的检查方法。

中药制剂组成药材品种多，经提取后成分复杂，无法界定具体含有抑菌作用的成分^[16]，目前本研究只能尽量降低整个制剂中所含抑菌成分的抑菌作用，将其对微生物检验的影响降到最低，未来将考虑转变研究方向，对在产品中持续出现且检出率较高的污染菌进行收集和分离鉴定，并将其作为新增试验菌完成方法适用性确认，使所建立的方法对于产品具有“专属性”，以提高结果准确性。

参考文献

- [1] 毕军, 赵胜宝. 痰咳净滴丸的工艺研究[J]. 医药导报, 2006, 25(12): 1311-1312.
- [2] 江永南, 莫红缨. 痰咳净不同剂型体外抗甲型流感病毒的实验研究[J]. 中药材, 2009, 32(6): 929-932.
- [3] 马秉智. 从剂型角度谈中成药合理用药[J]. 药品评价, 2012, 9(23): 15-17.
- [4] 王玲, 郭志廷, 杨峰, 等. 薄膜过滤法在中药常山散微生物限度检查中的应用研究[J]. 中国兽医杂志, 2019, 55(5): 99-103.

- [5] 易大为, 陈野, 潘强. 薄膜过滤法在局部给药制剂微生物限度检查中的应用[J]. 中国药事, 2008, 22(4): 342-345.
- [6] 滕钰, 薛咏兰, 黄婕, 等. 7组同名异型中成药微生物限度检查方法[J]. 中成药, 2019, 41(10): 2473-2477.
- [7] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(四部): 2020年版[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020.
- [8] 中国食品药品检定研究院. 中国药品检验操作规范[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2019.
- [9] 张光华, 余立. 聚山梨酯80和卵磷脂在化学药微生物限度检查时的中和作用[J]. 药物分析杂志, 2008, 28(7): 1127-1130.
- [10] 刘立. 薄膜过滤法的影响因素分析研究[J]. 北方药学, 2024, 21(4): 1-3.
- [11] 苑思坤, 李玉芝, 王红云. 微生物限度检查薄膜过滤法供试液预处理方法探讨[J]. 中国药业, 2010, 19(18): 42-43.
- [12] 马仕洪, 刘鹏, 杨利红, 等. 药品微生物限度检查方法适用性试验中加菌方式的实验研究[J]. 药物分析杂志, 2018, 38(5): 877-882.
- [13] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典分析检测技术指南[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2017.
- [14] 马秉智. 从剂型角度谈中成药合理用药[J]. 药品评价, 2012, 9(23): 15-17.
- [15] 严佳, 檀巧婷, 钟桂香, 等. 盐酸普萘洛尔凝胶的微生物限度检查方法学验证[J]. 儿科药学杂志, 2015, 21(5): 43-46.
- [16] 何春慧, 陈高萍, 程峰, 等. 5种含抑菌成分中药制剂微生物限度检查方法的建立[J]. 海峡药学, 2022, 34(1): 78-81.