

# 需氧菌总数计数方法研究示例与讨论

汤茜, 潘震宇\*, 李瑞莲\* (湖南省药品检验研究院, 长沙 410001)

**摘要 目的:** 比较《中国药典》2015 年版和 2010 年版应用平皿法进行药品微生物计数的异同, 探讨药典改版对方法建立的影响。**方法:** 按照《中国药典》2015 年版和 2010 年版对厄贝沙坦氢氯噻嗪片和丙酸氟替卡松鼻喷雾剂的微生物计数方法进行方法适用性或验证试验。**结果:** 确立了两种药物按新旧两版药典进行需氧菌总数和细菌数计数的方法。按照《中国药典》2010 年版, 两种药物均可采用培养基稀释法; 按照《中国药典》2015 年版, 确立两种药物采用薄膜过滤法进行需氧菌总数计数。**结论:** 两版药典试验结果相差较大, 表明药典改版后加强了方法的科学性和准确性; 平皿法尤其是培养基稀释法在 2015 年版药典实施以后, 实际应用有明显改变。

**关键词:** 厄贝沙坦氢氯噻嗪片; 丙酸氟替卡松鼻喷雾剂; 需氧菌总数; 平皿法

中图分类号: R446.5 文献标识码: A 文章编号: 1002-7777(2017)03-0305-07

doi:10.16153/j.1002-7777.2017.03.013

## On the Method of Total Aerobic Microbial Count

Tang Qian, Pan Zhenyu\*, Li Ruilian\* (Hunan Institute for Drug Control, Changsha 410001, China)

**Abstract Objective:** To compare the similarities and differences in application of pour plate method between the 2015 and the 2010 edition of *Chinese Pharmacopoeia*, and discuss the influence of pharmacopoeia revision on the method establishment. **Methods:** Suitability or verification tests on microbial count methods of irbesartan and hydrochlorothiazide tablets and Fluticasone Propionate Nasal Spray were carried out according to the 2015 and the 2010 edition of *Chinese Pharmacopoeia*. **Results:** The methods of total aerobic microbial count and bacteria count for two drugs were established according to the new and the old edition of Pharmacopoeia. For both drugs, culture media dilution method could be used for bacteria count according to the CP 2010 edition, and membrane filtration method could be used for total aerobic microbial count according to the CP 2015 edition. **Conclusion:** The test results differed greatly according to the two editions of Pharmacopoeia and it showed that the new edition was more scientific and accurate. After the implementation of the 2015 edition of Pharmacopoeia, there were great changes in the practical application of pour plate method, especially for medium dilution method.

**Keywords:** irbesartan and hydrochlorothiazide tablets; Fluticasone Propionate Nasal Spray; total aerobic microbial count; pour plate method

国家药典委员会发布的《中国药典》2015 年版编制大纲明确指出, 要加大力度进行药品无菌与微生物限度检查方法的建立与验证方面的标准

研究工作<sup>[1]</sup>, 2015 年版《中国药典》四部通则非无菌产品微生物限度检查法与国际标准趋于一致, 实现了与 ICH 要求的统一协调。改版后的药典对

基金项目: 湖南省自然科学基金 (编号 2015JJ6053)

作者简介: 汤茜, 高级实验师, 从事微生物检测研究; Tel: (0731) 82275845; E-mail: csqian@aliyun.com

通信作者: 潘震宇, 副主任药师, 从事药品检测研究; Tel: (0731) 82275835; E-mail: 458897782@qq.com

李瑞莲, 主任药师, 从事药品检测研究; E-mail: 472762280@qq.com

微生物计数方法的适用性试验程序进行了较大程度的修订<sup>[2-3]</sup>，所以在方法实施过程中，尤其在建立具体医药产品的微生物计数方法时，应根据修订内容进行调整，以适应2015年版《中国药典》的要求。在进行产品活菌计数时，平皿倾注法一直是首选的检测方法<sup>[4]</sup>，而在2015年版药典实施以后，该方法的实际应用将有明显改变。本文根据厄贝沙坦氢氯噻嗪片和丙酸氟替卡松鼻喷雾剂两种药品的微生物限度检查方法的研究结果，对具有一定抑菌作用药品的微生物限度检查方法进行探讨。其中厄贝沙坦氢氯噻嗪片为临床上普遍采用的厄贝沙坦和氢氯噻嗪协同降压药物<sup>[5-7]</sup>，丙酸氟替卡松鼻喷雾剂是预防和治疗过敏性鼻炎的常用药物，疗效确切，安全性高<sup>[8-10]</sup>。本研究结果对2015年版《中国药典》的贯彻执行将起到一定的示范作用。

## 1 仪器与材料

### 1.1 仪器

HTY-2000B集菌仪（杭州泰林生物技术设备有限公司）；BHC-1300 II A/B3生物安全柜（苏州净化设备有限公司）；MLS-3780全自动高压蒸汽灭菌器（日本SANYO公司）；Binder 240恒温培养箱（德国BINDER公司）；SPX-380生化培养箱（宁波东南仪器有限公司）；PL602-L电子天平（瑞士梅特勒-托利多公司）。

### 1.2 样品

厄贝沙坦氢氯噻嗪片（规格：150 mg/12.5 mg；每片含厄贝沙坦150 mg，氢氯噻嗪12.5 mg；湖南某制药公司生产）；丙酸氟替卡松鼻喷雾剂（规格：5 μg × 120喷，上海某制药公司生产）。

### 1.3 培养基和试剂

胰酪胨大豆琼脂培养基（批号：140701，北京三药科技开发公司）；营养琼脂培养基（批号：150410，北京三药科技开发公司）；胰酪大豆胨液体培养基（批号：20140108，北京奥博星生物技术有限责任公司）；营养肉汤培养基（批号：140123，北京三药科技开发公司）；FC752薄膜过滤器（批号：20150507，杭州泰林生物技术设备有限公司）。

### 1.4 菌种

金黄色葡萄球菌（*Staphylococcus aureus*）[CMCC（B）26003]、枯草芽孢杆菌（*Bacillus*

*subtilis*）[CMCC（B）63501]、铜绿假单胞菌（*Pseudomonas aeruginosa*）[CMCC（B）10104]、大肠埃希菌（*Escherichia coli*）[CMCC（B）44102]，均由中国医学细菌保藏管理中心提供。

### 1.5 稀释液及冲洗液

pH7.0氯化钠-蛋白胨缓冲液（批号：130614，北京三药科技开发有限公司）。

## 2 方法与结果

采用《中国药典》2015年版四部非无菌产品微生物限度检查<sup>[2]</sup>：微生物计数法（通则1105）对厄贝沙坦氢氯噻嗪片和丙酸氟替卡松鼻喷雾剂的需氧菌总数计数方法进行方法适用性试验研究；同时，按照《中国药典》2010年版二部附录XI J微生物限度检查法<sup>[3]</sup>，对上述样品的细菌数计数方法进行验证试验。

### 2.1 供试液制备

取本品10 g，加 pH7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液至100 mL，振摇使溶解，制成1：10的均匀供试液。用 pH7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液进一步稀释制成1：50的供试液。

### 2.2 需氧菌总数方法适用性试验

#### 2.2.1 菌液制备

接种枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、大肠埃希菌的新鲜培养物至胰酪大豆胨液体培养基中，35℃培养18~24 h，取此培养物用0.9%无菌氯化钠溶液稀释至菌落数约为不大于 $1 \times 10^4$  cfu · mL<sup>-1</sup>的菌悬液。

#### 2.2.2 试验方法

平皿法试验组：分别取“2.1”节的供试品溶液9.9 mL，加入“2.2.1”节的菌悬液各0.1 mL，充分混匀后，立即吸取1 mL置无菌平皿中，随即倾注胰酪大豆琼脂培养基，混匀，凝固，平行制备2组，35℃培养3 d。

培养基稀释法（增加培养基体积）试验组：取1：10供试品溶液9.9 mL，加入试验菌液0.1 mL，混匀后取1 mL分注5个平皿中，按2015年版《中国药典》平皿倾注法中增加培养基体积的方法进行试验。以5个平皿中菌落总数作为试验组菌落数，计算回收比值。

薄膜过滤法试验组：取1：10的供试液1 mL，加入100 mL pH7.0无菌氯化钠-蛋白胨缓冲溶液中，使分散均匀，抽滤入薄膜过滤器，全量滤过，

以pH7.0无菌氯化钠-蛋白胨缓冲溶液冲洗滤膜，每次100 mL，总冲洗量为300 mL，在最后一次冲洗液中加入不大于100 cfu的试验菌液，混匀，抽滤，取膜，菌面朝上贴于胰酪胨大豆琼脂培养基平板上，35℃培养3 d。

供试品对照组：取制备好的供试液，以稀释液代替菌液同试验组操作。

菌液对照组：取稀释液替代供试液，按试验组操作加入试验菌液。

### 2.3 细菌数计数方法验证试验

#### 2.3.1 菌液制备

方法同需氧菌总数菌液制备。接种菌株置营养肉汤培养基中，菌悬液含菌数约为50 ~ 100 cfu · mL<sup>-1</sup>。

#### 2.3.2 实验方法

平皿法试验组：分别取“2.1”节下的1 : 10供试品溶液1 mL置无菌平皿中，再加入“2.3.1”节下菌悬液各1 mL，立即倾注营养琼脂培养基，混匀，

凝固，平行制备2皿，35℃培养3 d。

培养基稀释法试验组：取“2.1”节下1 : 10供试品溶液0.2 mL，余下试验同平皿法试验组。

供试品对照组：除不加菌悬液，其余操作同试验组。

菌液对照组：除不加供试品溶液，其余操作同试验组。

### 2.4 实验结果

#### 2.4.1 平皿法

分别取1 : 10供试品溶液9.9 mL和1 mL，按2015年版和2010年版《中国药典》平皿法进行试验。厄贝沙坦氢氯噻嗪片和丙酸氟替卡松鼻喷雾剂供试品组均未检出微生物。厄贝沙坦氢氯噻嗪片试验结果见表1，按2015年版四株试验菌的回收比值都远远低于0.5，按2010年版仅枯草芽孢杆菌回收率未达到70%。丙酸氟替卡松鼻喷雾剂试验结果见表2，按2015年版和2010年版的平皿法操作，四株菌几乎都不生长，故平皿法均不能采用。

表1 厄贝沙坦氢氯噻嗪片常规平皿法回收试验结果

试验菌株	需氧菌总数 (2015年版《中国药典》) 平皿法 (倾注法)			细菌数 (2010年版《中国药典》) 平皿法		
	试验组 / cfu	菌液组 / cfu	回收 比值	试验组 / cfu	菌液组 / cfu	回收率 / %
枯草芽孢杆菌	7	79	0.09	37	79	46.8
金黄色葡萄球菌	9	91	0.10	67	91	73.6
铜绿假单胞菌	10	80	0.12	80	80	100.0
大肠埃希菌	12	62	0.19	66	62	106.4

表2 丙酸氟替卡松鼻喷雾剂常规平皿法回收试验结果

试验菌株	需氧菌总数 (2015年版《中国药典》) 平皿法 (倾注法)			细菌数 (2010年版《中国药典》) 平皿法		
	试验组 / cfu	菌液组 / cfu	回收 比值	试验组 / cfu	菌液组 / cfu	回收率 / %
枯草芽孢杆菌	0	79	0	0	79	0
金黄色葡萄球菌	0	91	0	1	91	1.1
铜绿假单胞菌	1	80	0.01	0	80	0
大肠埃希菌	2	62	0.03	1	62	1.6

### 2.4.2 培养基稀释法

取厄贝沙坦氢氯噻嗪片和丙酸氟替卡松鼻喷雾剂 1 : 10 供试品溶液 0.2 mL, 按 2010 年版《中国药典》培养基稀释法进行试验; 或取 1 : 10 供试品溶液 9.9 mL, 加入试验菌液 0.1 mL, 混匀后取 1 mL 分注 5 个平皿中, 按 2015 年版《中国药典》

平皿倾注法中增加培养基体积的方法进行试验。厄贝沙坦氢氯噻嗪片和丙酸氟替卡松鼻喷雾剂试验结果见表 3 和表 4, 按 2010 年版《中国药典》培养基稀释法, 两种药物四株菌回收率均达到 70% 以上, 而按 2015 年版药典均达不到要求, 增加培养基体积收效甚微。

表 3 厄贝沙坦氢氯噻嗪片培养基稀释法回收试验结果

试验菌株	需氧菌总数 (2015 年版《中国药典》) 1 : 10 供试液, 增大培养基体积 (5 倍)			细菌数 (2010 年版《中国药典》) 培养基稀释法, 0.2 mL		
	试验组 / cfu	菌液组 / cfu	回收 比值	试验组 / cfu	菌液组 / cfu	回收率 / %
	枯草芽孢杆菌	11	82	0.13	63	82
金黄色葡萄球菌	12	73	0.16	71	73	97.3
铜绿假单胞菌	11	87	0.13	90	87	103.4
大肠埃希菌	14	85	0.16	84	85	98.8

表 4 丙酸氟替卡松鼻喷雾剂培养基稀释法回收试验结果

试验菌株	需氧菌总数 (2015 年版《中国药典》) 1 : 10 供试液, 增大培养基体积 (5 倍)			细菌数 (2010 年版《中国药典》) 培养基稀释法, 0.2 mL		
	试验组 / cfu	菌液组 / cfu	回收 比值	试验组 / cfu	菌液组 / cfu	回收率 / %
	枯草芽孢杆菌	2	82	0.02	76	82
金黄色葡萄球菌	2	73	0.03	74	73	101.4
铜绿假单胞菌	3	87	0.03	84	87	96.6
大肠埃希菌	5	85	0.06	88	85	103.5

### 2.4.3 增加稀释液体积

鉴于 2 种药物按 2015 年版《中国药典》增加培养基体积的方法进行试验, 试验组均达不到回收要求, 考虑采用增加稀释液体积的方法进行适用性试验。分别取厄贝沙坦氢氯噻嗪片和丙酸氟替卡松鼻喷雾剂 1 : 50 供试品溶液 9.9 mL, 加入 0.1 mL 试验菌液, 混匀, 取 1 mL 按平皿倾注法试验。试验结果见表 5。与 1 : 10 供试品溶液试验结果比较, 厄贝沙坦氢氯噻嗪片回收比值有所提高, 但仍未达到 0.5;

丙酸氟替卡松鼻喷雾剂回收比值明显提高, 4 组试验组均超过 0.7, 符合 2015 年版药典要求。

### 2.4.4 薄膜过滤法

取厄贝沙坦氢氯噻嗪片和丙酸氟替卡松鼻喷雾剂 1 : 10 供试品溶液, 依照 “2.2.2” 节下薄膜过滤法进行试验。试验菌株为枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、大肠埃希菌、白色念珠菌和黑曲霉, 试验结果分别见表 6、表 7。各试验组回收比值均在 0.9 以上, 方法可行。

表 5 2 种药物增加稀释液体积 (1 : 50 供试液) 回收试验结果

试验菌株	需氧菌总数 (2015 年版《中国药典》) 厄贝沙坦氢氯噻嗪片			需氧菌总数 (2015 年版《中国药典》) 丙酸氟替卡松鼻喷雾剂		
	试验组 / cfu	菌液组 / cfu	回收 比值	试验组 / cfu	菌液组 / cfu	回收 比值
枯草芽孢杆菌	11	67	0.16	54	67	0.81
金黄色葡萄球菌	20	41	0.49	32	41	0.78
铜绿假单胞菌	13	82	0.16	79	82	0.96
大肠埃希菌	12	44	0.27	42	44	0.95

表 6 厄贝沙坦氢氯噻嗪片薄膜过滤法回收试验结果

试验菌株	需氧菌总数 (2015 年版《中国药典》) 薄膜过滤法, 1 : 10 供试液 1 mL, 冲 300 mL		
	试验组 / cfu	菌液组 / cfu	回收 比值
枯草芽孢杆菌	42	46	0.91
金黄色葡萄球菌	64	62	1.03
铜绿假单胞菌	82	84	0.98
大肠埃希菌	58	59	0.98
白色念珠菌	74	74	1.00
黑曲霉	36	35	1.03

表 7 丙酸氟替卡松鼻喷雾剂薄膜过滤法回收试验结果

试验菌株	需氧菌总数 (2015 年版《中国药典》) 薄膜过滤法, 1 : 10 供试液 10 mL, 冲 300 mL		
	试验组 / cfu	菌液组 / cfu	回收 比值
枯草芽孢杆菌	54	58	0.93
金黄色葡萄球菌	58	61	0.95
铜绿假单胞菌	79	75	1.05
大肠埃希菌	83	88	0.94
白色念珠菌	85	90	0.94
黑曲霉	36	34	1.06



以上试验中各供试品组均未检出微生物。表中菌落数均为两皿平均菌落数。

#### 2.4.5 实验总结

将2种药物采用新旧版药典进行需氧菌总数或

细菌数方法试验情况汇总, 结果见表8。2种药物按2010年版药典, 均可采用培养基稀释法进行细菌数计数; 按2015年版药典, 宜采用薄膜过滤法进行需氧菌总数计数。

表8 2种药物需氧菌总数或细菌数方法试验结果汇总

试验药物	需氧菌总数(2015年版《中国药典》)				细菌数(2010年版《中国药典》)	
	平皿法	培养基稀释法	增加稀释液体积	薄膜过滤法	平皿法	培养基稀释法
厄贝沙坦氢氯噻嗪片	不可行	不可行	不可行	可行	不可行	可行
丙酸氟替卡松鼻喷雾剂	不可行	不可行	可行, 但按限度标准不适宜	可行	不可行	可行

### 3 讨论

1) 进行新旧两版药典比较研究的项目虽然由2010年版的细菌数改为2015年版的需氧菌总数, 但本文采用的试验菌株均为两版药典涉及的金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、铜绿假单胞菌和大肠埃希菌, 以上述4株试验菌的方法研究情况进行对比说明, 可充分反映药典改版后平皿计数法应用情况的改变。

2) 厄贝沙坦氢氯噻嗪片采用平皿法, 2010年版和2015年版药典回收结果相差甚远(见表1), 按2010年版药典进行试验, 仅枯草芽孢杆菌的回收率未达到要求, 为46.8%, 其余3株试验菌回收率均为70%以上; 而按2015年版药典4株试验菌回收率均低于20%。当其采用培养基稀释法进行试验时(见表3), 按2010年版药典操作, 各试验组回收率均超过70%, 方法可行; 而按2015年版药典进行方法适用性试验, 回收率均低于16%。

3) 丙酸氟替卡松鼻喷雾剂按新旧两版药典试验, 均不可采用平皿法。而采用培养基稀释法时, 两版药典的试验结果相差巨大(见表4), 2010年版药典方法回收率均达到90%以上, 2015年版药典方法最高为6%。以上数据充分表明新旧版药典试验结果的不一致性, 提示2015年版药典改版后, 原来按照2010年版药典建立的微生物计数方法很有可能不再适用, 需按照新版药典重新建立方法用于检验。

4) 对2种药物的试验结果进行总结, 厄贝沙坦氢氯噻嗪片和丙酸氟替卡松鼻喷雾剂均属具有

一定抗菌活性的药物, 执行2010年版《中国药典》时, 2种药物均可按照培养基稀释法(0.2 mL/皿)建立方法; 2015年《中国药典》改版后, 要求建立方法时需将试验菌液加入供试品溶液混匀后进行试验, 方法修订后更可反映供试液对试验菌的抗菌作用, 2种药物采用培养基稀释法, 试验组均远远达不到回收要求。这一事实凸显了药典改版在方法科学性和准确性方面的改进程度。

5) 为达到规定的回收比值, 按照2015年版《中国药典》增加稀释液体积的方法进行试验, 丙酸氟替卡松鼻喷雾剂1:10供试液改为1:50供试液时, 回收比值大幅提高, 证明此方法对消除某些药物的抑菌活性效果甚佳; 但应用于厄贝沙坦氢氯噻嗪片时, 收效明显不如前者, 表明消除抑菌活性的方法应用于不同对象呈现的结果可能会有“大不同”, 唯有通过试验分步筛选, 最终选择合适的方法<sup>[11]</sup>。

6) 对于采用薄膜过滤法进行检验的品种, 若将菌液加入供试液再行试验, 将检测不到细菌, 仍需在薄膜过滤冲洗后再加菌。故药典改版对薄膜过滤法的方法冲击不大<sup>[12-13]</sup>。差异主要体现在平皿倾注法中, 本研究中厄贝沙坦氢氯噻嗪片需由培养基稀释法改为薄膜过滤法, 而丙酸氟替卡松鼻喷雾剂虽可采用1:50供试液进行试验, 但考虑到限度标准的问题, 最终也确立采用薄膜过滤法进行需氧菌总数检查。以上结果提示平皿法尤其是培养基稀释法在2015年版药典实施以后, 实际应用将有明显改变。

## 参考文献:

- [1] 国家药典委员会.《中华人民共和国药典》2015年版编制大纲[EB/OL]. (2013-07-14) [2016-04-29]. <http://www.chp.org.cn/cms/about/current/program.html>.
- [2] 中国药典:四部[S]. 2015.
- [3] 中国药典:二部[S]. 2010.
- [4] 许华玉,杜芸,钱文静,等.药品微生物限度检查法中细菌和真菌计数方法的验证试验[J].中国中药杂志, 2005, 30(24):1918-1920.
- [5] 纪鹏大.厄贝沙坦氢氯噻嗪治疗原发性高血压的疗效观察[J].中国现代药物应用, 2009, 3(1):122-123.
- [6] 周丹凤.厄贝沙坦氢氯噻嗪片与苯磺酸氨氯地平片治疗高血压病的疗效及经济学探讨[J].中国医院用药评价与分析, 2016, 16(6):753-755.
- [7] 李文凤.联用通心络胶囊和厄贝沙坦氢氯噻嗪片治疗冠心病的效果观察[J].当代医药论丛, 2016, 14(12):88-89.
- [8] 王怡,陈珺.丙酸氟替卡松鼻喷雾剂改善儿童过敏性鼻炎症状以及控制哮喘反复发作的价值[J].现代中西医结合杂志, 2015, 18:2002-2004.
- [9] 陈利雷,赵娟.丙酸氟替卡松鼻喷雾剂(辅舒良)联合丹溪玉屏风颗粒治疗儿童变态反应性鼻炎的疗效观察[J].世界最新医学信息文摘, 2016, 38:98-100.
- [10] 李祥东.枸地氯雷他定联合丙酸氟替卡松鼻喷雾剂治疗变应性鼻炎的疗效观察[J].遵义医学院学报, 2015, 38(6):626-628.
- [11] 彭洁,林丽英,梁桂霞,等.头孢氨苄等抗生素药品微生物限度检查法的研究[J].今日药学, 2009, 19(10):11-13.
- [12] 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, 22:342-345.
- [13] 汤茜,李瑞莲.盐酸莫西沙星片微生物限度方法适用性研究[J].国外医药抗生素分册, 2016, 37(4):172-176.

(收稿日期 2016年5月10日 编辑 邹宇玲)