

• 基础研究 •

3 种骨科外用散剂的微生物限度检查方法适用性研究

福建中医药大学附属宁德市中医院制剂室 (宁德 352000) 潘丕阗 吴 安 吴军军¹ 沈廷明

【摘 要】 目的 建立医院制剂宽筋健骨散、舒筋消肿散和蠲痹搜风散的微生物限度检查方法。**方法** 根据《中国药典》2020 版规范建立宽筋健骨散等 3 种骨科外用散剂的微生物限度检查方法, 并对上述方法进行适用性研究。**结果** 宽筋健骨散采用培养基稀释法, 蠲痹搜风散和舒筋消肿散采用常规法分别测定污染试验菌的回收比值, 各试验组的回收比值均在 0.5~2 范围内, 说明上述方法适用性良好。控制菌检查接种于 1:100 供试液中, 结果检出试验菌, 说明该方法适用。**结论** 宽筋健骨散等 3 种骨科外用散剂的微生物限度检查方法适用性良好, 可以作为制剂成品的微生物限度检查方法。

【关键词】 微生物限度检查; 宽筋健骨散; 舒筋消肿散; 蠲痹搜风散

【中图分类号】 R982 **【文献标识码】** B **【文章编号】** 1002-2600(2023)02-0111-03

宽筋健骨散、蠲痹搜风散和舒筋消肿散为骨科外用散剂, 是我院制剂协定处方, 其中宽筋健骨散 (原熏洗方Ⅲ号), 由肉桂、吴茱萸、独活、茯苓、威灵仙等 13 味中药粉碎混合而成, 具有舒利关节、壮骨强筋的功效, 适用于筋骨冷痛、腿脚麻木、胀痛、风湿性关节痛等。蠲痹搜风散 (原熏洗方Ⅱ号), 由制南星、白薇、赤芍、红花、川芎等 17 味中药粉碎混合而成, 具有除湿蠲痹、搜风刮络的功效, 适用于各型痹症表现为筋骨冷痛、腿脚麻木、胀痛、关节僵硬等。舒筋消肿散 (原熏洗方Ⅰ号), 由红花、赤芍、桂枝、合欢皮、制川乌等 14 味中药粉碎混合而成, 具有活血消肿、舒筋活络的功效, 适用于跌打损伤恢复期局部疼痛、痹症肌肉无力萎缩、骨折脱位后功能关节受限等。宽筋健骨散等 3 种骨科外用散剂在我院临床应用多年, 效果显著, 值得进一步推广应用。本文的目的是建立宽筋健骨散等骨科外用散剂的微生物限度检查方法, 并进行相应的方法学适用性研究。

1 材料与方法

1.1 材料:

1.1.1 试验用阳性菌株: 铜绿假单胞菌 [CCMC (B) 10104]、金黄色葡萄球菌 [CCMC (B) 26003]、枯草芽胞杆菌 [CCMC (B) 63501]、白色念球菌 [CCMC (F) 98001]、黑曲霉 [CCMC (F) 98003], 以上各菌株传代次数均不超过 5 代。

1.1.2 供试品: 宽筋健骨散 (批号: 202005001、202005002、202005003)、蠲痹搜风散 (批号: 202004001、202004002、202004003) 和舒筋消肿

散 (批号: 202004004、202004005、202004006), 由宁德市中医院制剂室提供。

1.1.3 培养基: 胰酪大豆胨液体培养基 (TSB)、胰酪大豆胨琼脂培养基 (TSA)、沙氏葡萄糖液体培养基 (SDB)、沙氏葡萄糖琼脂培养基 (SDA)、甘露醇氯化钠琼脂培养基 (MSN)、溴化十六烷基三甲铵琼脂培养基 (CAM)。

1.1.4 设备: 电热恒温培养箱和霉菌培养箱。

1.2 方法:

1.2.1 计数用阳性菌液的制备:

1.2.1.1 阳性细菌溶液的制备: 分别取铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽胞杆菌成品菌株, 用菌珠复溶液溶解后, 再将菌液接种于无菌 TSB 中, 30~35℃ 培养 18~24 h, 作为新鲜培养物, 分别吸取新鲜培养物 10 mL, 加无菌 TSB 90 mL, 逐级稀释, 用无菌 TSB 稀释至每 1 mL 含菌量 $10^3 \sim 10^4$ cfu 的阳性菌液。

1.2.1.2 白色念球菌悬液的制备: 另取白色念球菌, 复溶后接种至无菌 SDB 中, 20~25℃ 培养 2~3 d, 作为新鲜培养物, 吸取新鲜培养物 10 mL, 加无菌 SDB 90 mL, 逐级稀释, 用无菌 SDB 稀释至每 1 mL 含菌量 $10^3 \sim 10^4$ cfu 的阳性菌液。

1.2.1.3 黑曲霉孢子悬液的制备: 另取黑曲霉, 复溶后制成菌悬液接种于 SDA 中, 20~25℃ 培养 5~7 d, 加入 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, 洗脱孢子, 制得孢子混悬液。吸取孢子混悬液 1.0 mL 于试管中, 加入含 0.05% 聚山梨酯-80 的 pH 7.0 无菌氯化钠-

基金项目: 福建中医药大学校管临床专项 (XB2021206)

1 通信作者

蛋白胨缓冲液 9.0 mL, 逐级稀释至每 1 mL 含孢子量 $10^3 \sim 10^4$ cfu 的黑曲霉孢子悬液。

1.2.2 供试液的制备: 取供试品 10 g, 加无菌 TSB 至 100 mL, 振摇, 使分散均匀, 制得 1:10 供试液。吸取 1:10 供试液 10 mL 至 TSB 90 mL 中, 制得 1:100 供试液; 吸取 1:100 供试液 20 mL, 至 TSB 80 mL 中, 制得 1:500 供试液。

1.2.3 供试液需氧菌总数、霉菌及酵母菌总数计数方法: 麝香搜风散和舒筋消肿散采用常规法, 吸取 1:500 供试液 1.0 mL 接种于 $\Phi 90$ mm 平皿中, 平行 2 平皿; 宽筋健骨散采用培养基稀释法, 吸取 1:500 供试液 0.2 mL 接种于 $\Phi 90$ mm 平皿中, 平行 5 平皿; 需氧菌组灌注无菌 TSA, 于 30~35 °C 培养 3 d。霉菌及酵母菌组灌注 SDA, 于 24~28 °C 培养 5 d。

1.2.4 计数方法适用性试验:

1.2.4.1 试验组: 取 1:500 供试液 9.9 mL, 分别加入 0.1 mL 阳性菌液、菌悬液或孢子悬液, 使含菌量不超过 100 cfu/mL, 混匀即得, 照常规法或培养基稀释法进行计数检查。

1.2.4.2 菌液组: 分别吸取 0.1 mL 阳性菌液、菌悬液或孢子悬液接种于 9.9 mL 无菌 TSB 中, 混合均匀, 使含菌量不超过 100 cfu/mL, 照常规法或培养基稀释法进行计数检查。

1.2.4.3 供试品对照组: 取 1:500 供试液, 照常规法或培养基稀释法进行计数检查。

1.2.4.4 空白对照组: 取无菌 TSB, 照常规法或培养基稀释法进行计数检查。

1.2.4.5 微生物回收与结果判断: 照 1.2.3 条件培养, 统计平皿菌落数, 回收比值 $R = (\text{试验组菌落数} - \text{供试品对照组菌落数}) / \text{菌液组菌落数}$ 。当 R 值在 0.5~2 范围内时, 说明该计数检查方法适用性良好。

1.2.5 控制菌检查适用性试验: 宽筋健骨散、麝香搜风散和舒筋消肿散均为骨科外用散剂, 需要检查的控制菌为金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌。取

金黄色葡萄球菌或铜绿假单胞菌阳性菌液 0.1 mL, 接种于 1:100 供试液 9.9 mL 中, 混合均匀, 制得试验组供试液。分别取试验组供试液、1:100 供试液、阳性菌液和空白对照用无菌 TSB 各 1.0 mL, 接种于 $\Phi 90$ mm 平皿中, 平行 2 平皿。金葡菌检查组灌注 MSN, 铜绿菌检查组灌注 CAM, 置 30~35 °C 培养 3 d; 霉菌和酵母菌计数检查, 置 24~28 °C 培养 5 d。观察各组平皿阳性菌生长情况。

1.2.6 微生物限度标准: 需氧菌总数每 1 g 不超过 10^4 cfu, 霉菌和酵母菌总数每 1 g 不超过 10^2 cfu, 每 1 g 不得检出金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌^[1]。

2 结果

2.1 计数方法适用性试验: 麝香搜风散和舒筋消肿散采用常规法检查, 宽筋健骨散采用培养基稀释法检查, 其计数方法适用性试验下各阳性菌回收比值见表 1。

表 1 计数方法适用性试验下各阳性菌回收比值结果

试验项目	试验次数	铜绿假单胞菌	金黄色葡萄球菌	枯草芽孢杆菌	白色念珠菌	黑曲霉
舒筋消肿散, 1:500 供试液, 常规法	1	0.81	1.22	1.36	0.68	0.91
	2	0.77	1.45	1.61	0.61	0.88
	3	0.94	1.33	1.55	0.75	1.09
麝香搜风散, 1:500 供试液, 常规法	1	0.79	1.14	1.51	0.79	1.06
	2	0.69	1.26	1.66	0.75	1.19
	3	0.58	1.07	1.43	0.88	1.01
宽筋健骨散, 1:500 供试液, 培养基稀释法	1	0.71	0.66	0.91	0.58	0.88
	2	0.86	0.79	0.78	0.68	0.81
	3	0.77	0.68	0.89	0.63	0.71

根据表 1, 宽筋健骨散等 3 种骨科外用散剂在相应的微生物限度检查方法下, 经计数方法适用性试验, 回收比值均在 0.5~2 范围内, 说明建立的计数检查方法适用性良好。

2.2 控制菌检查方法适用性试验: 宽筋健骨散等 3 种骨科外用散剂均采用 1:100 供试液, 进行常规法检查, 其检查方法适用性试验结果见表 2 和图 1 (见封四)。

表 2 控制菌检查适用性试验结果

试验项目	铜绿假单胞菌采用 CAM 平皿检查				金黄色葡萄球菌采用 MSN 平皿检查			
	试验组	菌液组	供试品对照组	空白对照组	试验组	菌液组	供试品对照组	空白对照组
舒筋消肿散	+	+	—	—	+	+	—	—
麝香搜风散	+	+	—	—	+	+	—	—
宽筋健骨散	+	+	—	—	+	+	—	—

根据表 2 和图 1 (见封四) 试验结果, 宽筋健骨散等 3 种骨科外用散剂控制菌适用性试验中, 供试品对照组和空白对照组均未检出控制菌; 而试验组和菌液组均检出铜绿菌或金葡菌阳性菌落, 且阳性菌落生长良好, 说明建立的控制菌检查方法适用性良好。

3 讨论

通过对舒筋消肿散、蠲痹搜风散和宽筋健骨散的处方分析, 可以为选择微生物限度检查方法提供方向。舒筋消肿散和蠲痹搜风散的处方中不含挥发性抑菌成分, 故可采用常规法进行微生物计数检查和控制菌检查。宽筋健骨散处方中含有肉桂, 其挥发油成分 (如桂皮醛等) 具有一定的抗抑菌作用^[2], 因此需要采用培养基稀释法, 通过稀释其挥发性成分最大限度地减弱其抗抑菌作用, 从而使其微生物限度计数检查的回收比值 R 不低于 0.5。

控制菌检查是评估制剂污染微生物风险的重要方法之一^[3]。宽筋健骨散等 3 种骨科外用散剂制作工艺简单, 仅粉碎、混合、分装等工序, 部分药材应用简单炮制工艺前处理, 在加工过程中需要注意

微生物的污染。铜绿假单胞菌和金黄色葡萄球菌属于条件致病菌, 可能引起皮肤伤口、血液的感染^[4]。虽然宽筋健骨散等制剂应用于皮肤表面完整的部位, 熏蒸泡洗过程中引起感染的可能性较小, 但是依旧提示存在着一定的用药风险, 因此需要进一步完善控制菌检查方法, 并在工艺方面增加灭菌流程, 例如在粉碎、混合后增加微波灭菌或辐照灭菌, 再进行分装和包装^[5]。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典, 2020 年版. 四部 [S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020.
- [2] 赵美林, 黄萍, 杨霞, 等. 中药桂皮醛体外抑菌和抗炎活性的研究 [J]. 广东牙病防治, 2008, 16 (10): 441-443.
- [3] 胡昌勤. 药品微生物控制现状与展望 [J]. 中国药学杂志, 2015, 50 (20): 1747-1751.
- [4] 邓彦, 王娅珂, 韩晓宇, 等. 不同品种根类中药饮片耐胆盐革兰阴性菌污染研究 [J]. 中国中药杂志, 2017, 42 (1): 4135-4141.
- [5] 许曾, 刘洪盛, 张世波. 中药散剂的质量问题分析与对策探讨 [J]. 云南中医中药杂志, 2020, 41 (6): 39-41.

《福建医药杂志》征订启事

《福建医药杂志》是福建省卫生健康委员会主管、福建省医学会主办、福建省医学科学研究院承办的综合性医药学术期刊, 着重报道本省医药卫生科研成果及防治疾病经验, 反映其进展与水平, 并为各级医药卫生技术人员提供学术交流园地; 立足本省、面向全国, 深受广大医务人员欢迎。从 1996 年以来相继荣获全国优秀科技期刊三等奖、福建省优秀期刊一等奖及华东地区优秀期刊奖; 并成为美国《化学文摘》(CA) 收录期刊, 中国学术期刊综合评价数据库来源期刊, 中国期刊网、中国学术期刊光盘版入编期刊, 万方数据资源系统数字化期刊群入网期刊, 中国核心期刊 (遴选) 数据库收录期刊。2001 年被国家新闻出版总署、国家科技部评为中国期刊方阵双效期刊。本刊主要栏目有科技创新、政策解读、继续教育、慢性非传染性疾病防控、影像学读片、学科年度进展、国外指南摘译、论著、临床研究、基础研究、综述、调查报告、医院管理、护理园地、基层医生园地等, 是各级医药卫生技术人员的良师益友。

本刊为双月刊, 国内外公开发行 (CN 35-1071/R, ISSN 1002-2600), 邮发代号 34-6, 双月中旬出版。大 16 开本, 每册定价 16 元, 全年定价 96 元。欢迎广大读者到邮局订阅或直接汇款至本刊编辑部订阅。

通信地址: 福建省福州市鼓楼区五四路 7 号《福建医药杂志》编辑部, 邮编 350001

电话: 0591-87516804; 电子邮箱: fjyzz@aliyun.com

投稿采编平台 (官网) 网址: www.fjyzz.cn

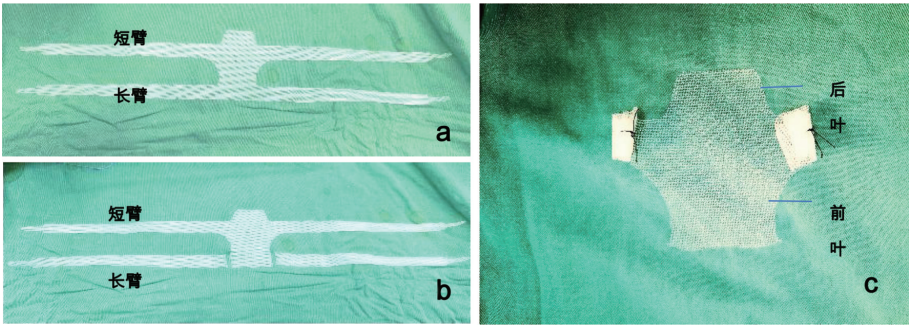
微信公众号名称: 福建医药杂志; 微信号: fujianyiyaozazhi; 微信二维码:



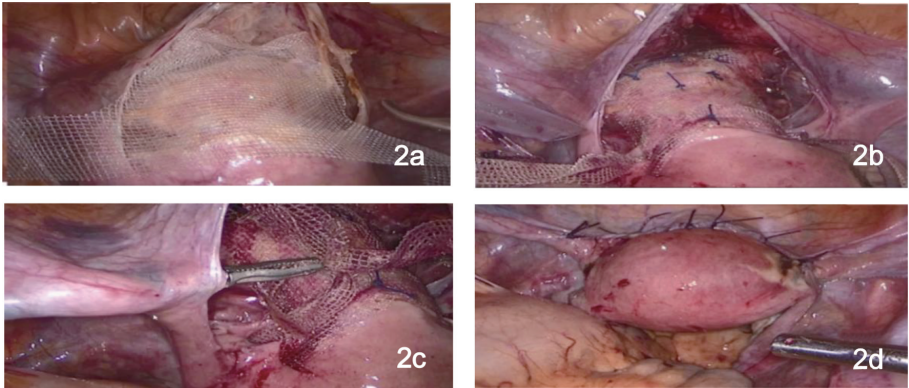
《福建医药杂志》编辑部

腹腔镜下侧腹壁悬吊术治疗重度盆腔脏器脱垂的近期疗效评价

(见正文第 20 页)



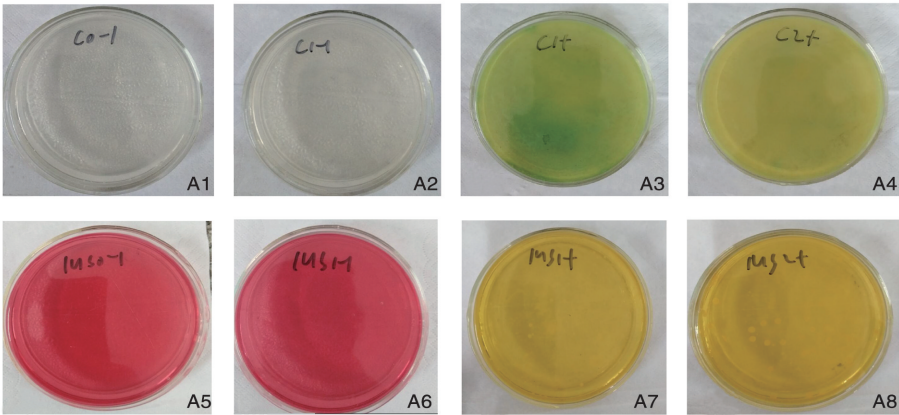
注：a，裁剪前钛乐“T4”网片；b，裁剪后钛乐“T4”网片，保留两侧短臂呈双叶“十”形状；c，“十”双叶网片分为前叶（长舌状）、后叶（短舌状），可将两侧臂预先卷曲固定进腹。
图 1 修剪后的钛乐“T4”网片



注：2a，铺平修剪后网片，前叶置于膀胱宫颈间隙、阴道间隙；2b，可吸收线固定钛网片；2c，弯钳夹住同侧网片短臂沿腹膜后隧道拉至皮下；2d，可吸收线缝合腹膜反折，包埋网片。
图 2 腹腔镜钛网片侧腹壁悬吊术实施过程

3 种骨科外用散剂的微生物限度检查方法适用性研究

(见正文第 111 页)



注：A1 为 CAM 空白对照组；A2 为供试品对照组；A3 为铜绿菌阳性对照组；A4 为铜绿菌试验组；A5 为 MSN 空白对照组；A6 为供试品对照组；A7 为金葡菌阳性对照；A8 为金葡菌试验组。
图 1 控制菌检查适用性试验平皿培养情况 (35℃，3 d)