

清热明目茶的微生物限度检查研究

贺钰钰

陕西服装工程学院, 中国·陕西 咸阳 712046

【摘要】为了验证清热明目茶的微生物限度检查方法, 本文以常规法与培养基稀释法进行对比分析, 发现常规法更加适合应用在清热明目茶中霉菌和酵母菌计数及控制菌的检查中, 而培养基稀释法则更适合应用于清热明目茶的细菌计数中。

【关键词】清热明目茶; 微生物; 限度检查; 培养基稀释法; 常规法

Study on Microbial Limit Test of Qingre Mingmu Tea

He Yuyu

Shaanxi Institute of Fashion Engineering, China Xi'an, Shaanxi 712046

[Abstract]In order to verify the microbial limit inspection method of Qingre Mingmu tea, this paper compares and analyzes the conventional method and the medium dilution method, and finds that the conventional method is more suitable for the inspection of mold and yeast counts and control bacteria in Qingre Mingmu tea. The medium dilution method is more suitable for the bacterial count of Qingre Mingmu tea.

[Key words]clearing heat and improving eyesight tea; microorganism; limit test; medium dilution method; conventional method

【基金项目】申报人: 陕西服装工程学院, 基金陕西服装工程学院大学生创新创业基金2021年度资助项目(省级), 项目名称(论醒目茶清肝明目作用的研究)项目编号: S202113125018。

引言

清热明目茶主要是以决明子、菊花、甜叶菊三种药材制成的, 可平肝明目, 清热祛风, 临床上常常应用在高血压、头晕目眩与头痛等症状治疗中。而决明子在古代便已经作为药材, 《神农本草经》中将决明子归列为上上品, 称其可以治疗眼疾, 常用可明目轻身, 且可降血脂、血压, 抗氧化、衰老等。为了保障所选择的检查验证方法更加适用于清热明目茶的细菌、霉菌、酵母菌计数测试与控制菌的检查, 明确供试液制备、测试方法、检测系统适用于清热明目茶微生物限度检查验证。根据《中国药典》与《中国药品检验标准操作规范》构建清热明目茶微生物限度检查验证方法, 并对此方法进行测试分析。

1 清热明目茶微生物限度检查验证方法测试环境与原料

1.1 测试环境设置

基于《中国药典》相关规定, 于10000级环境洁净度与100级局部洁净度的单向流空气的无菌实验室内进行测试, 阳性菌则于符合国家级生物安全标准的生物安全柜中进行测试。

1.2 测试仪器

清热明目茶微生物限度检查验证方法测试用仪器主要有: BSC-3FA2 型号生物安全柜, 济南泰医生物技术有限公司; DHP-9012 型号电热恒温培养箱, 上海灯晟仪器制造有限公司; MJ-70-I 型号微电脑霉菌培养箱, 济南爱来宝仪器设备有限公司; DYX-DHS 型号隔水式电热恒温培养箱, 河北慧采科技有限公司; YXQ-50G 型号立式压力蒸汽灭菌器, 浙江纳德科学仪器有限公司; BA-JZQ12 型号匀质器, 长沙巴跃仪器有限公司。

1.3 测试试样

以福建南少林药业有限公司生产的清热明目茶为微生物限度检查验证方法测试试样。

1.4 稀释剂

以自制0.9%无菌氯化钠溶液与pH7.0无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液为稀释剂。

1.5 培养基

清热明目茶微生物限度检查验证方法测试用培养基都是由中国药品生物制品检定所提供的, 主要有: 营养肉汤培养基; 营养

琼脂培养基; 玫瑰红钠琼培养基; 改良马丁培养基; 曙红亚甲蓝琼脂培养基-EMB; 胆盐乳糖培养基; 4-甲基伞形酮葡萄糖苷酸-MUG。

基于《中国药典》附录规定, 计数培养基应与计数培养基适用性检查标准要求明确相符, 而控制菌检查用培养基则应与促生长、指示、抑制能力的标准要求明确相符。

1.6 菌种检查验证

大肠埃希菌[CMCC(B)44102]、白色念珠菌[CMCC(F)98001]、金黄色葡萄球菌[CMCC(B)26003]、枯草芽孢杆菌[CMCC(B)63501]、黑曲霉[CMCC(F)98003], 测试用菌株传代3次。其中大肠埃希菌[CMCC(B)44102]、枯草芽孢杆菌[CMCC(B)63501]、金黄色葡萄球菌[CMCC(B)26003]、白色念珠菌[CMCC(F)98001]由中国医学菌种保藏中心提供, 而黑曲霉[CMCC(F)98003]则由中国药品生物制品检定所提供。

2 清热明目茶微生物限度检查验证方法测试方法与结果分析

2.1 菌液制备与检查验证

首先, 制备菌液。提取1ml经过35°C温度环境培养21±3h所得大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌的营养肉汤培养物, 以0.9%无菌氯化钠溶液进行10倍递增式稀释大肠埃希菌至10⁻⁷、金黄色葡萄球菌至10⁻⁷、金黄色葡萄球菌至10⁻⁷约50-100cfu/ml, 以待用。再提取1ml经过25°C温度环境培养21±3h所得白色念珠菌液体培养物, 以0.9%无菌氯化钠溶液进行10倍递增式稀释白色念珠菌至10⁻⁵约50-100cfu/ml, 以作为活菌计数待用。再提取经过25°C温度环境培养7d的黑曲霉斜面培养物, 以4ml0.9%无菌氯化钠溶液清洗黑曲霉孢子, 汲取1ml孢子悬液, 以0.9%无菌氯化钠溶液进行10倍递增式稀释黑曲霉斜面培养物至10⁻⁶约50-100cfu/ml, 以作为活菌计数待用。

其次, 检查验证菌液。提取1ml金黄色葡萄球菌10⁻⁷、大肠埃希菌10⁻⁷、枯草芽孢杆菌10⁻⁵稀释液, 分别以45°C玫瑰红钠琼培养基20ml进行注皿, 分别平行测试两皿, 于30-35°C温度环境下培养2d, 以计数。再提取1ml白色念珠菌10⁻⁵稀释液、黑曲霉10⁻⁶孢子悬液, 分别以45°C玫瑰红钠琼培养基20ml进行注皿, 分别平行测试两皿, 于23-28°C温度环

境下培养, 每日观察并计数。基于《中国药典》相关规定, 细菌、霉菌、酵母菌方法测试所选菌悬液的含菌量需控制在 50-100cfu/ml 之间, 而控制菌方法测试所选菌悬液的含菌量则需控制在 10-100cfu/ml 之间。

2.2 供试溶液制备

提取清热明目茶最小包装 10g/袋 的两袋, 根据微生物限度检查法的相关规定称量 10g, 添加 pH7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液到 100mL, 匀浆仪每分钟 2000 转, 3min 均匀混合, 便生成了 1:10 的供试溶液。

2.3 细菌、霉菌、酵母菌计数方法测试

以常规法对细菌、霉菌、酵母计数法进行 3 次独立的平行测试, 分别平行测试 2 皿/菌液。其中测试组, 提取 1ml:10 供试溶液与 1ml 测试菌液, 注入至平皿内, 并及时注入营养琼脂培养基或者玫瑰红钠琼脂培养基, 在凝固之后放置于规定温度环境下培养 1-3d, 每日观察结果并详细记录; 菌液组, 提取 1ml 菌悬液, 注入至平皿内, 并及时注入营养琼脂培养基或者玫瑰红钠琼脂培养基, 在凝固之后放置于规定温度环境下培养 1-3d, 每日观察结果并详细记录。测试结果为两皿均值, 具体如表 1 所示。

表 1 基于常规法的细菌、霉菌、酵母菌计数方法检查验证测试结果

菌种/批号	大肠埃希菌	金黄色葡萄球菌	枯草芽孢杆菌	白色念珠菌	黑曲霉	
测试组	303	61	41	41	46	48
	414	61	29	40	52	45
	415	45	31	34	47	51
菌液组	303	71	61	59	61	60
	414	65	66	60	61	59
	415	60	69	61	67	59
供试对照组	303	0	1	1	1	1
	414	0	0	0	0	0
	415	0	0	0	0	0
测试组回收率	303	87%	66%	68%	74%	79%
	414	95%	44%	67%	85%	77%
	415	76%	45%	56%	71%	87%

由表可知, 以常规法 3 次平行测试金黄色葡萄球菌于枯草芽孢杆菌的测试组回收率都低于 70%, 不符合基于《中国药典》标准要求, 据此选择培养基稀释法做进一步测试。

以培养基稀释法进行 3 次独立平行测试, 平行测试 2min/菌液。其中测试组, 提取 2ml:10 供试溶液, 每 1ml 供试溶液等量分别注入 2 各平皿内, 添加测试菌液 1ml, 并及时注入营养琼脂培养基, 在凝固之后放置于规定温度环境下培养 1-3d, 每日观察结果并详细记录; 菌液组, 提取 1ml 菌悬液, 注入至平皿内, 并及时注入营养琼脂培养基或者玫瑰红钠琼脂培养基, 在凝固之后放置于规定温度环境下培养 1-3d, 每日观察结果并详细记录; 供试对照组, 提取 2ml:10 供试溶液, 每 1ml 供试溶液等量分别注入 2 各平皿内, 并及时注入营养琼脂培养基, 在凝固之后放置于规定温度环境下培养 1-3d, 每日观察结果并详细记录。

测试结果发现, 以培养基稀释法测试 3 次平行测试金黄色葡萄球菌于枯草芽孢杆菌的测试组回收率都高于 70%, 与《中国药典》标准要求相符。

2.4 控制菌检查验证方法测试

大肠埃希菌测试根据常规法进行 3 次平行测试。其中测试组, 提取 10ml:10 供试溶液放置于 100ml 胆盐乳糖培养基内, 添加 50-100cfu/ml 大肠埃希菌, 放置于 35° C 温度环境的阳性培养箱内进行 1d 培养, 根据大肠埃希菌检查验证法进行检查测试; 阳性对照组, 提取 50-100cfu/ml 大肠埃希菌添加于 100ml 胆盐乳糖培养基内, 放置于 35° C 温度环境的阳性培养箱内进行 1d 培养, 根据大肠埃希菌检查验证法进行检查测试; 供试对照组, 提取 10ml:10 供试溶液放置于 100ml 胆盐乳糖培养基内, 放置于 35° C 温度环境的阳性培养箱内进行 1d 培养, 根据大肠埃希菌检查验证法进行检查测试; 阴性菌对照组, 提取 10ml:10 供试溶液放置于 100ml 胆盐乳糖培养基内, 添加 50-100cfu/ml 金黄色葡萄球菌, 放置于 35° C 温度环境的阳性培养箱内进行 1d 培养, 根据大肠埃希菌检查验证法进行检查测试; 阴性对照组, 提取 10ml 稀释液添加于 100ml 胆盐乳糖培养基内, 放置于 35° C 温度环境的培养箱内进行 1d 培养, 根据大肠埃希菌检查验证法进行检查测试。

大肠菌群测试根据常规法进行 3 次平行测试。其中测试组, 提取 10ml:10 供试溶液放置于 100ml 乳糖胆盐发酵培养基内, 添加 50-100cfu/ml 大肠埃希菌, 放置于 35° C 温度环境的阳性培养箱内进行 1d 培养, 根据大肠菌群的检查验证法进行检查测试; 阳性对照组, 提取 50-100cfu/ml 大肠埃希菌添加于 10ml 乳糖胆盐发酵培养基内, 放置于 35° C 温度环境的阳性培养箱内进行 1d 培养, 根据大肠菌群的检查验证法进行检查测试; 供试对照组, 提取 10ml:10 供试溶液放置于 100ml 乳糖胆盐发酵培养基内, 放置于 35° C 温度环境的阳性培养箱内进行 1d 培养, 根据大肠菌群的检查验证法进行检查测试; 阴性菌对照组, 提取 10ml:10 供试溶液放置于 100ml 乳糖胆盐发酵培养基内, 添加 50-100cfu/ml 金黄色葡萄球菌, 放置于 35° C 温度环境的阳性培养箱内进行 1d 培养, 根据大肠菌群的检查验证法进行检查测试; 阴性对照组, 提取 1ml 稀释液添加于 10ml 乳糖胆盐发酵培养基内, 放置于 35° C 温度环境的阳性培养箱内进行 1d 培养, 根据大肠菌群的检查验证法进行检查测试。

测试结果发现, 大肠埃希菌、大肠菌群阳性组与测试组生长较好, 这就表明清热明目茶对于大肠埃希菌与大肠菌群没有抑菌作用或者抑菌作用相对较差。总之, 细菌、霉菌、酵母菌计数检查验证法测试中, 常规法对于大肠埃希菌、白色念珠菌、黑曲霉菌的回收率都高于 70%, 而培养基稀释法对于枯草芽孢杆菌与金黄色葡萄球菌的回收率都高于 70%, 都符合《中国药典》相关要求。因此控制菌大肠埃希菌与大肠菌群检查可以选择常规法进行检查, 在测试中, 细菌可通过培养基稀释法测试, 而霉菌与酵母菌可通过常规法测试, 大肠埃希菌与大肠菌群的检查验证可选择常规法。

参考文献:

- [1] 雍跃文, 庞来祥, 赵美峰, 等. 枸杞明目袋泡茶的制备与薄层鉴别[J]. 医学信息, 2011, 24(10): 190.
- [2] 周捷, 阮健, 袁静. 清热明目茶 HPLC 特征指纹图谱研究及多成分含量测定[J]. 药物分析杂志, 2020, 40(2): 312-320.
- [3] 周红艳, 徐建东. 一测多评法测定清热明目茶中大黄素、大黄酚与大黄素甲醚含量[J]. 中国生化药物杂志, 2016, 36(3): 180-183.
- [4] 方敏. 清热明目茶的微生物限度检查方法验证试验研究[J]. 医学信息, 2015(z3): 195-196.
- [5] 游伟平, 曹小明. 万应茶微生物限度检查方法验证[J]. 海峡药学, 2010, 22(9): 65-66.

作者简介:

贺钰钰(2002.02.02-), 女, 汉族, 陕西子长人, 在读大学生, 研究方向: 制药工程。