

11 种药用淀粉及衍生物的微生物限度 检查法适用性试验

李趣嫦, 李文靖, 张帆
(广东省药品检验所, 广州 510663)

摘要 目的: 建立 5 种药用淀粉及其 6 种衍生物的微生物限度检查的方法适用性。**方法:** 按照《中国药典》2015 年版微生物限度检查法进行方法学的建立和验证, 并对所研究的 11 种淀粉及衍生物样品中的微生物含量进行检测。**结果:** 需氧菌总数及霉菌和酵母菌总数计数均可用平皿法检查, 大肠埃希菌检查可用直接接种法检查。**结论:** 淀粉及其衍生物一般无抑菌性, 不同厂家生产的淀粉产品微生物含量有所差异, 在选用时需考察。

关键词: 辅料; 淀粉; 衍生物; 微生物限度检查

中图分类号: R 921.2 文献标识码: A 文章编号: 1009-3656(2020)-1-0000-0

doi: 10.19778/j.chp.2020.01.00?

Suitability of microbial limit test methods for 11 kinds of medicinal starches and its derivatives

LI Quchang, LI Wenjing, ZHANG Fan
(Guangdong Institute for Drug Control, Guangzhou 510663, China)

Abstract Objective: To establish the suitability of microbial limit test method for 5 kinds of medicinal starches and 6 derivatives. **Methods:** The microbial limit test methods were established and validated according to the Chinese Pharmacopoeia 2015. Then the microbial limits of 11 kinds of starches and derivatives were tested with the established methods. **Results:** The plate method was used for total counts of aerobic bacteria, and fungi and yeasts, and the direct inoculation method was used for *Escherichia coli*. **Conclusion:** The starches and derivatives have not bacteriostasis generally. The microbial contents present in starches produced by different manufacturers are different, and thus it is necessary to investigate it before selection.

Key words: excipients; starch; derivative; microbial limit test

淀粉是植物通过光合作用合成并储存在植物体种子、果实和根茎里中的一种碳水化合物, 是人类的膳食主要能量来源^[1]。通过一系列物理或化学方法改性后的淀粉及衍生物安全无毒, 价格便宜, 具有稳定性高、糊化性强、凝胶强度好、抗菌性、耐水性等理化特性, 被广泛地应用于食品药品、生物医药、日化包装等领域^[2-5]。淀粉在药品的应用中主要作为

辅料用于片剂和胶囊剂等, 一般可作为赋形剂、稀释剂、黏合剂和崩解剂^[6-8]。根据《中华人民共和国药典》(以下简称《中国药典》)2015 年版的规定, 非无菌药用辅料应该进行微生物限度检查^[9]。然而, 目前对于淀粉及衍生物类辅料的微生物限度研究鲜有报道。有鉴于此, 本文开展了对 5 种淀粉和 6 种淀粉衍生物的微生物限度检查的方法适用性研究, 同

时指出其微生物限度检查法进行日常检测时所需注意的问题,旨在为检测机构和药品、辅料生产厂家提供参考,为更好地监测和控制其微生物限度提供科学依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器

BRE240 型生化培养箱(法国 Froilabo 公司); Thermo Scientific 1300 Series A2 型生物安全柜(美国赛默飞世尔科技有限公司);JA21002 型精密电子天平(上海舜宇恒平科学仪器有限公司);Lab dancer 漩涡混合器(德国 IKA 艾卡集团);ED 型恒温水浴箱(德国优莱博公司)。

1.2 菌种

金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) [CMCC(B)26 003]、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*) [CMCC(B)10 104]、大肠埃希菌(*Escherichia coli*) [CMCC(B)44 102]、白色念珠菌(*Candida albicans*) [CMCC(F)98 001] 和黑曲霉(*Aspergillus niger*) [CMCC(F)98 003] 均购自中国食品药品检定研究院;枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) [ATCC6633] 购自省食品微生物安全工程技术研究中心食品安全菌种保藏中心。

1.3 培养基

胰酪大豆胨琼脂、胰酪大豆胨液体、沙氏葡萄糖琼脂、沙氏葡萄糖液体、麦康凯液体和麦康凯琼脂,均购自广东环凯微生物科技有限公司。培养基的适用性检查均符合《中国药典》2015 年版规定。

1.4 试药

玉米淀粉(A 公司生产,批号 170801,171210,171211;B 公司生产,批号 E4429,E4755,E4807);豌豆淀粉(B 公司生产,批号 WR47V,WS50V,WS57V);马铃薯淀粉(B 公司生产,批号 VNI24,VNI19,VNI20);木薯淀粉(C 公司生产,批号 180601,180702,180705);小麦淀粉(B 公司生产,批号 E4820,E4659);羟丙基淀粉(来源为豌豆,C 公司生产,批号 180301,180302,180303;来源为木薯,C 公司生产,批号 20171019,20171117,20180113;来源为玉米,C 公司生产,批号 170505,170506,170507,E 公司生产,批号 EG7527);预胶化羟丙基淀粉(C 公司生产,批号 20170830,20171125,20170927);羟丙基二淀粉磷酸酯(C 公司生产,批号 20171114,20171115,20180125;E 公司生产,批号 FFS1070);预胶化羟丙基二淀粉磷酸酯(E 公司生产,批号

170369k,180089R,180113R);羧甲基淀粉钠(A 公司生产,批号 180601,180602,180603;D 公司生产,批号 20171041,20180404);辛烯基琥珀酸淀粉钠(E 公司生产,批号 DGI6608,KGI7665)。

2 方法与结果

2.1 菌液制备

金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、铜绿假单胞菌、白色念珠菌和黑曲霉,按《中国药典》2015 年版的方法制成 $10^3 \sim 10^4$ cfu · mL⁻¹ 的菌悬液或孢子悬液;大肠埃希菌,按《中国药典》2015 年版的方法制成 < 100 cfu · mL⁻¹ 的菌悬液。

2.2 供试液的制备

取供试品 10 g,加 pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液至 100 mL,混匀,制成 1:10 供试液。①

取供试品 10 g,加 pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液至 200 mL 或 300 mL,边加入样品边搅拌,混匀,制成 1:20 或 1:30 供试液;用 1:20 供试液适量,用 pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液稀释成 1:50 或 1:100 供试液。②

2.3 计数方法适用性试验

2.3.1 需氧菌总数、霉菌和酵母菌总数 平皿法:各取①或②的 1:10 或 1:20 或 1:30 或 1:50 或 1:100 供试液 10 mL 于灭菌试管中,加入相应试验菌 0.1 mL 使其最终浓度为每 1 mL 不大于 100 cfu 菌液,混匀,从试管中吸取 1 mL 注入平皿中,立即倾注胰酪大豆胨琼脂或沙氏葡萄糖琼脂,待凝,培养,每株试验菌平行制备 2 个平皿,测定试验组菌落数,同法测定菌液组和供试品对照组的菌落数。按公式 [各菌株回收 = (试验组的平均菌落数-供试品对照组的平均菌落数/菌液对照组的平均菌落数)] 计算回收,结果见表 1~3。

2.3.2 控制菌检查 大肠埃希菌:a 各取①供试液 10 mL,接种至 100 mL 的胰酪大豆胨液体培养基中;或 b 各取②1:20 供试液 20 mL,接种至 200 mL 的胰酪大豆胨液体培养基中;或 c 各取②1:30 供试液 30 mL,接种至 300 mL 的胰酪大豆胨液体培养基中,在上述接种完的培养基中各加入每 1 mL 含菌量不大于 100 cfu 的大肠埃希菌菌悬液 1 mL,混匀,按控制菌大肠埃希菌项下的检查法进行适用性试验,结果见表 3。

2.4 样品检测

取样品,分别按“2.1.2”项下方法制备供试液,依法检查。检测结果见表 4。

表 1 需氧菌总数回收

Tab. 1 Recoveries of validation of aerobic bacteria

样品名称 (Sample names)	方法 (Method)	金黄色葡萄球菌 (<i>S. aureus</i>)			铜绿假单胞菌 (<i>P. aeruginosa</i>)			枯草芽孢杆菌 (<i>B. subtilis</i>)			白色念珠菌 (<i>A. niger</i>)			黑曲霉 (<i>C. albicans</i>)		
		1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
		玉米淀粉 (Corn starch)	1:10 平皿法 (1:10 plate)	0.9	0.9	0.8	0.9	0.7	0.7	0.6	0.8	1.2	0.6	1.0	0.6	1.0
豌豆淀粉 (Pea starch)	1:10 平皿法 (1:10 plate)	1.0	1.0	0.6	1.1	1.0	0.9	0.9	0.9	1.0	0.9	0.8	1.1	0.7	0.9	0.7
马铃薯淀粉 (Potato starch)	1:10 平皿法 (1:10 plate)	1.1	0.7	0.6	1.1	0.6	0.9	1.0	0.8	1.1	0.9	1.0	0.7	0.7	1.0	0.8
木薯淀粉 (Tapioca starch)	1:10 平皿法 (1:10 plate)	1.2	0.8	1.0	0.9	0.8	1.0	1.0	1.1	0.8	0.9	0.8	0.9	0.7	0.6	0.7
小麦淀粉 (Wheat starch)	1:10 平皿法 (1:10 plate)	0.9	1.0	1.2	0.8	1.2	1.0	0.9	0.8	0.6	0.9	1.2	0.7	0.8	0.9	1.0
羟丙基淀粉 (Hydroxypropyl starch)	1:10 平皿法 (1:10 plate)	1.1	0.8	0.9	0.6	0.7	0.6	0.8	1.0	0.7	0.6	0.7	0.9	0.9	1.1	0.8
羟丙基二淀粉磷酸酯 (Hydroxypropyl distarch phosphate)	1:10 平皿法 (1:10 plate)	1.0	0.9	1.0	0.8	0.7	1.1	0.7	1.1	1.0	0.9	1.2	0.8	0.9	0.6	0.7
辛烯基琥珀酸淀粉钠 (Sodium octenyl succinate starch)	1:10 平皿法 (1:10 plate)	0.7	0.8	0.8	0.9	1.1	0.9	1.0	1.2	0.7	1.0	0.8	0.9	1.0	1.0	0.8
预胶化羟丙基二淀粉磷酸酯 (Pregelated hydroxypropyl distarch phosphate)	1:20 平皿法 (1:20 plate)	0.4	/	/	1.1	/	/	0.7	/	/	1.2	/	/	0.9	/	/
	1:50 平皿法 (1:50 plate)	0.8	1.1	0.7	1.0	1.1	0.7	1.0	1.2	1.1	1.2	0.9	1.0	1.0	0.5	0.7
羧甲基淀粉钠 (Carboxymethyl starch sodium)	1:20 平皿法 (1:20 plate)	0.7	/	/	0.4	/	/	0.1	/	/	1.0	/	/	1.1	/	/
	1:50 平皿法 (1:50 plate)	1.0	/	/	1.0	/	/	0.1	/	/	0.9	/	/	1.0	/	/
	1:100 平皿法 (1:100 plate)	1.0	1.0	1.0	1.0	0.5	1.0	1.2	0.6	0.5	1.2	1.1	1.0	0.9	1.2	1.1
预胶化羟丙基淀粉 (Pregelated hydroxypropyl starch)	1:30 平皿法 (1:30 plate)	0.7	0.9	0.9	0.5	1.0	1.2	0.6	0.6	0.9	0.6	1.2	1.0	1.2	1.0	0.9

注：“/”表示无需检测 (Note: Don't need to test)

表 2 霉菌和酵母菌总数回收

Tab. 2 Recoveries of validation of mycete and saccharomycetes

样品名称 (Sample names)	方法 (Method)	白色念珠菌(<i>A. niger</i>)			黑曲霉(<i>C. albicans</i>)		
		1	2	3	1	2	3
玉米淀粉(Corn starch)	1:10 平皿法 (1:10 plate)	0.8	1.0	1.0	1.0	0.7	0.6
豌豆淀粉(Pea starch)	1:10 平皿法 (1:10 plate)	0.9	1.2	0.8	0.9	0.6	1.0
马铃薯淀粉(Potato starch)	1:10 平皿法 (1:10 plate)	0.9	1.2	0.8	0.8	0.9	0.7
木薯淀粉(Tapioca starch)	1:10 平皿法 (1:10 plate)	0.8	1.0	1.2	0.7	0.9	0.7
小麦淀粉(Wheat starch)	1:10 平皿法 (1:10 plate)	1.1	0.9	1.2	0.8	0.8	0.9
羟丙基淀粉(Hydroxypropyl starch)	1:10 平皿法 (1:10 plate)	1.0	0.8	0.9	0.7	1.0	0.8
羟丙基二淀粉磷酸酯(Hydroxypropyl distarch phosphate)	1:10 平皿法 (1:10 plate)	0.9	1.0	0.9	0.8	0.9	1.1
辛烯基琥珀酸淀粉钠(Sodium octenyl succinate starch)	1:10 平皿法 (1:10 plate)	1.0	0.7	0.6	1.0	0.7	0.7
预胶化羟丙基二淀粉磷酸酯(Pregelated hydroxypropyl distarch phosphate)	1:20 平皿法(1:20 plate)	1.2	0.6	0.7	0.8	0.8	0.8
羧甲基淀粉钠(Carboxymethyl starch sodium)	1:20 平皿法(1:20 plate)	1.0	0.9	0.8	0.7	0.8	1.0
预胶化羟丙基淀粉(Pregelated hydroxypropyl starch)	1:30 平皿法(1:30 plate)	1.2	0.7	1.2	0.8	1.0	1.0

表3 方法适用性试验结果

Tab. 3 The results of method suitability

样品名称(Sample names)	方法(Method)		
	需氧菌总数 (Total counts of aerobic bacteria)	霉菌和酵母菌总数 (total counts of fungi and yeasts)	大肠埃希菌 (<i>E. coli</i>)
玉米淀粉(Corn starch)	1:10 平皿法(1:10 plate)	1:10 平皿法(1:10 plate)	a
豌豆淀粉(Pea starch)			
马铃薯淀粉(Potato starch)			
木薯淀粉(Tapioca starch)			
小麦淀粉(Wheat starch)			
羟丙基淀粉(Hydroxypropyl starch)			
羟丙基二淀粉磷酸酯(Hydroxypropyl distarch phosphate)			
辛烯基琥珀酸淀粉钠(Sodium octenyl succinate starch)			
预胶化羟丙基二淀粉磷酸酯(Pregelated hydroxypropyl distarch phosphate)	1:50 平皿法(1:50 plate)	1:20 平皿法(1:20 plate)	b
羧甲基淀粉钠(Carboxymethyl starch sodium)	1:100 平皿法(1:100 plate)		
预胶化羟丙基淀粉(Pregelated hydroxypropyl starch)	1:30 平皿法(1:30 plate)	1:30 平皿法(1:30 plate)	c

表4 样品的微生物检测结果

Tab. 4 The microbial limit test results of samples

样品名称 (Sample names)	批号 (Batch No.)	检测结果(Detection results)		
		需氧菌总数 (Total counts of aerobic bacteria)/(cfu · g ⁻¹)	霉菌和酵母菌总数 (Total counts of fungi and yeasts)/(cfu · g ⁻¹)	大肠埃希菌 (<i>E. coli</i>)/ (cfu · g ⁻¹)
玉米淀粉(Corn starch)	170801	40	<10	-
	171210	1.6 × 10 ²	<10	-
	171211	10	<10	-
	E4429	<10	<10	-
	E4755	<10	<10	-
	E4807	<10	<10	-
	WR47V	40	<10	-
豌豆淀粉(Pea starch)	WS50V	1.0 × 10 ²	40	-
	WS57V	2.6 × 10 ²	1.2 × 10 ²	-
	VNI24	<10	<10	-
马铃薯淀粉(Potato starch)	VNI19	<10	<10	-
	VNI20	<10	<10	-
	180601	15	<10	-
木薯淀粉(Tapioca starch)	180702	30	30	-
	180705	45	15	-
	E4820	<10	<10	-
小麦淀粉(Wheat starch)	E4659	<10	<10	-
	180301	<10	<10	-
羟丙基淀粉(Hydroxypropyl starch)	180302	10	<10	-
	180303	<10	<10	-
	20171019	1.2 × 10 ²	20	-
	20171117	2.2 × 10 ²	20	-
	20180113	15	<10	-
	170505	2.3 × 10 ³	1.4 × 10 ²	-
	170506	2.9 × 10 ³	1.6 × 10 ²	-

续表 4 (Tab. 4 continued)

样品名称 (Sample names)	批号 (Batch No.)	检测结果 (Detection results)		
		需氧菌总数 (Total counts of aerobic bacteria)/(cfu · g ⁻¹)	霉菌和酵母菌总数 (Total counts of fungi and yeasts)/(cfu · g ⁻¹)	大肠埃希菌 (<i>E. coli</i>)/ (cfu · g ⁻¹)
羟丙基二淀粉磷酸酯 (Hydroxypropyl distarch phosphate)	170507	1.7 × 10 ³	1.1 × 10 ²	-
	EG7527	10	<10	-
	20171114	45	<10	-
	20171115	95	10	-
	20180125	1.2 × 10 ²	<10	-
羧甲基淀粉钠 (Carboxymethyl starch sodium)	FFS1070	<10	<10	-
	180601	<1.0 × 10 ²	<20	-
	180602	<1.0 × 10 ²	<20	-
	180603	<1.0 × 10 ²	<20	-
	20171041	<1.0 × 10 ²	<20	-
辛烯基琥珀酸淀粉钠 (Sodium octenyl succinate starch)	20180404	<1.0 × 10 ²	<20	-
	DGI6608	<10	<10	-
	KGI7665	<10	<10	-
预胶化羟丙基二淀粉磷酸酯 (Pregelated hydroxypropyl distarch phosphate)	170369k	<50	<20	-
	180089R	<50	<20	-
	180113R	<50	<20	-
预胶化羟丙基淀粉 (Pregelated hydroxypropyl starch)	20170830	60	<30	-
	20171125	30	<30	-
	20170927	<30	<30	-

注：“-”未检出 (No detected)

3 讨论

试样中,羧甲基淀粉钠、预交化羟丙基二淀粉磷酸酯和预交化羟丙基淀粉在水中能迅速溶胀,分散成粘稠胶体状溶液,导致难以吸取,故需加大稀释液的体积,制备成 1:20 或 1:30 的供试液,使其黏稠度降低,以利于实验的可操作性;且在供试液制备时,需一边搅拌一边加入样品,这样可利于样品分散均匀,避免样品结团。

实验中发现样品羧甲基淀粉钠对枯草芽孢杆菌有较弱的抑菌性,尝试取 1:20 和 1:50 的供试液各 1 mL 采用薄膜过滤法去除其抑菌性,实验过程中发现供试液能顺利进行冲洗过滤,但取出滤膜时可看见样品被截留在滤膜上,且粘稠成片状,导致滤膜上存留较多的冲洗液,培养后造成细菌的菌落蔓延成片难以计数,而采用平皿法则不会出现此情况,故需氧菌总数的计数方法最终为 1:100 供试液,采用平皿法。

从表 2 样品检测结果可知,各个厂家生产的产品污染微生物含量有较大差别,故对其建立方法并

做产品验收是非常必要的。

药品微生物限度标准中,药用辅料仅规定检查需氧菌总数、霉菌和酵母菌总数,本文是根据此类辅料一般用于口服制剂,故对有潜在危害的致病菌大肠埃希菌进行方法适用性及检测。

参考文献

- [1] 邱宝伟, 邹倩, 王淑瑶, 等. 淀粉在包装材料领域中的应用 [J]. 塑料工业, 2018, 46(3):13
QIU BW, ZOU Q, WANG SY, *et al.* Application of starch in packing materials [J]. China Plast Ind, 2018, 46(3):13
- [2] 陶利, 渠广民, 李兆明, 等. 多孔淀粉在食品药品中的应用进展 [J]. 食品与药品, 2018, 20(6):480
TAO L, QU GM, LI ZM, *et al.* Application of porous starch in food and medicine [J]. Food Drug, 2018, 20(6):480
- [3] 李辰, 李坚斌, 聂卉. 抗性淀粉及其在食品工业中的应用 [J]. 中国粮油学报, 2017, 32(1):141
LI C, LI JB, NIE H. Resistant starch and its application in food industry [J]. J Chin Cereal Oil Ass, 2017, 32(1):141
- [4] 陈景鑫, 孙蕊, 马赛楠. 变性淀粉在食品中的应用研究综述 [J]. 江苏调味副食品, 2016, 145(2):4

- CHEN JX, SUN R, MA SN. A review on the application of modified starch in food [J]. Jiangsu Condiment Subsidiary Food, 2016, 145(2):4
- [5] 叶发银, 赵国华. 纳米级改性淀粉及食品应用研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2018, 44(2):256
- YE FY, ZHAO GH. Research progress on nanosized modified starches and their application in food industry[J]. Food Fermentat Ind, 2018, 44(2):256
- [6] 李玉红. 玉米淀粉在医药片剂中的应用[J]. 工企医刊, 2014, 27(4):961
- LI YH. Application of corn starch in medical tablet[J]. Med J Ind Ent, 2014, 27(4):961
- [7] 江峰. 5种淀粉类辅料吸湿行为初步研究[J]. 海峡药学, 2018, 30(12):13
- JIANG F. Preliminary study on the hygroscopic behavior of 5 kinds of starch excipients[J]. Strait Pharm J, 2018, 30(12):13
- [8] 帅放文, 章家伟, 王向峰, 等. 新型羟丙基淀粉空心胶囊替代明胶胶囊的可行性研究[J]. 中南药学, 2015, 13(8):827
- SHUAI FW, ZHANG JW, WANG XF, *et al.* New vacant capsules from hydroxypropyl starch in fluconazole[J]. Cent South Pharm, 2015, 13(8):827
- [9] 中华人民共和国药典 2015 年版. 四部[S]. 2015:140
- ChP 2015. Vol IV[S]. 2015:140

(收稿日期:2019-05-07)