

## 生物检定

## 50 种中成药微生物限度检查法的适用性试验及结果分析

李趣嫦, 曾璞, 肖建光, 江艳芳, 林丽英

(广东省药品检验所, 广州 510180)

**摘要 目的:**按照中国药典 2015 年版进行中成药的微生物限度检查法适用性试验, 以达到减少中成药微生物日常检测方法建立工作量和提高检测效率的目的。**方法:**按照中国药典 2015 年版通则 1105、1106 和 1107, 采用平皿法和薄膜过滤法分别对包括口服溶液剂、颗粒剂、丸剂、胶囊剂和片剂的 5 类 50 种(每类 10 种)常见中成药进行需氧菌、霉菌和酵母菌检查法的适用性试验。**结果:**需氧菌总数计数: 口服溶液剂 1 种可以采用原液平皿法, 剩下 9 种采用 1:10 平皿法检查; 颗粒剂 9 种可以采用 1:10 平皿法, 剩下 1 种采用 1:20 平皿法检查; 10 种胶囊剂和 10 种丸剂全部均需稀释后再采用平皿法进行检查; 片剂 3 种可采用 1:10 平皿法, 5 种需稀释后采用平皿法, 剩下 2 种则需要采用薄膜过滤法检查。霉菌和酵母菌总数计数: 口服溶液剂全部可以采用原液平皿法, 颗粒剂、丸剂、胶囊剂和片剂全部可以采用 1:10 平皿法检查。**结论:**中成药口服液和颗粒剂的抑菌性一般较弱, 宜在较低稀释级下采用平皿法进行微生物检测; 丸剂和胶囊剂大的抑菌作用一般比较明显, 宜采用高稀释级平皿法检测; 片剂有些抑菌作用很弱, 有些抑菌作用则很强, 需根据实际情况采用不同稀释级平皿法或薄膜过滤法检测。

**关键词:**微生物限度; 适用性试验; 中国药典 2015 年版; 中成药; 颗粒剂; 丸剂; 胶囊剂; 片剂; 口服溶液剂

中图分类号: R 917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793(2017)12-2214-10

doi: 10.16155/j.0254-1793.2017.12.15

## Microbial limit test for determination of 50 Chinese patent drugs and results analysis

LI Qu-chang, ZENG Pu, XIAO Jian-guang, JIANG Yan-fang, LIN Li-ying

(Guangdong Institute for Drug Control, Guangzhou 510180, China)

**Abstract Objective:** To establish and validate the microbial limit test methods for determination of Chinese patent drugs (CPTs), via "Chinese Pharmacopoeia 2015", to achieve the purposes of reducing daily workload for method development and improving test efficiency. **Methods:** According to the general guidelines of 1105, 1106, and 1107 in Chinese Pharmacopoeia 2015, the experiments were performed by using plate method and membrane filtration method to validate the aerobic bacteria, mycete, and saccharomycetes test methods for determination of 50 CPTs including oral liquids, granules, pills, capsules, and tablets (10 drugs for each form). **Results:** For the

第一作者 Tel: (020) 32086612; E-mail: liquchang@sohu.com

test of count of the aerobic bacteria, one oral liquids sample can be carried out by original solution plate method, and the remaining 9 using 1:10 plate method. 1:10 plate method can be used for 9 granules drugs, and 1:20 plate method was used for the rest one. All the pills and capsules investigated were performed with dilution and then plate method. Three tablets can be tested with 1:10 plate method, 5 should be diluted and then tested by plate method, and the remaining 2 must be tested by membrane filtration method. For the test of enumeration of mycete and saccharomycetes, all of the investigated oral liquids could be carried out by original solution plate method, and all of the investigated granules, pills, capsules, and tablets were tested by 1:10 plate method. **Conclusion:** The antibacterial activities of CPTs with forms of oral liquid and granule were weak generally, and they could be tested by plate method at low level of dilution. The antibacterial activities of many CPTs with forms of pill and capsule were obvious, and thus they should be tested by plate method with high dilution level. The antibacterial activities of CPTs with form of tablet vary greatly, and plate method with different dilution and membrane filtration method should be used for their microbial limit test depending on the actual situation.

**Keywords:** microbial limit; validation test; Chinese Pharmacopoeia 2015 edition; Chinese patent drugs; granules; pills; capsules; tablets; oral liquids

中药是我国传统药物的总称,是我国医药产业的重要组成部分,由于具有药效作用明显,副作用小,价格便宜,容易获得等优点而广泛应用于治疗和预防各种疾病<sup>[1-3]</sup>。根据世界卫生组织(WHO)的定义,中药主要包括中药材、中药提取物、中药饮片和中成药等<sup>[4-5]</sup>。中成药是指以中药材为原料,在中医药理论的指导下,按规定处方和标准制成一定剂型的现代药物,是现今最为常用的中药制剂,常见的中成药制剂有口服液(糖浆剂)、颗粒剂、胶囊剂、片剂、丸剂、散剂和膏剂等<sup>[6]</sup>。

中成药的使用非常广泛,并且有不断上升的趋势,其作用、疗效、安全性等问题成为了一个备受关注的社会问题<sup>[3-5]</sup>。药品检验是目前保证药物质量和安全性的一个有效手段<sup>[3,7-8]</sup>,其中,药品的微生物检验和控制是药品安全性保障的一项重要措施<sup>[9]</sup>。由于微生物是活体生物,药品在生产、运输和储存的过程中很容易受到微生物污染,并且微生物的检验结果经常会受到药物种类、剂型、检验技术等多种因素的影响,因此,在进行药品的微生物检验之前,检测方法必须经过适用性试验。中成药由于组成复杂,剂型众多,微生物检测方法的适用性试验就显得更为重要<sup>[10-12]</sup>。

随着中国药典2015年版的颁布,药品微生物限度检查法在检查内容、检查方法、培养体系等方面都发生了很大变化<sup>[13-14]</sup>,这给中成药生产企业和药品检验机构带来了新的挑战。本文按照中国药典

2015年版<sup>[15]</sup>微生物计数法(通则1105)和控制菌检查法(通则1106),针对中成药中的口服溶液剂、颗粒剂、胶囊剂、片剂和丸剂这5类常见的中成药,每类选取10种共50种具有代表性的供试品,进行微生物限度检查法的适用性试验,并对检验结果进行分析讨论,找出中成药微生物限度检查适用性试验的技巧,为中成药生产企业和药品检验机构提供参考,以达到减少方法建立工作量,提高检测效率的目的。

## 1 仪器与材料

### 1.1 仪器

LRH-250F生化培养箱(上海一恒科技有限公司),LT-IBX220F生化培养箱(立德泰勃(上海)科学仪器有限公司),BSC-1600 II<sub>A2</sub>生物安全柜(苏净集团安泰空气技术有限公司),JA21002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(艾卡集团),WJ-6无菌检测仪(天津市罗根科技有限公司),ED型恒温水浴箱(优莱博公司)。

### 1.2 供试品

抗病毒口服液(O1)、牛黄蛇胆川贝口服液(O2)、克感利咽口服液(O3)、健儿消食口服液(O4)、柴胡口服液(O5)、通天口服液(O6)、鼻渊舒口服液(O7)、小儿消积止咳口服液(O8)、清开灵口服液(O9)、清热解毒口服液(O10)、复方金银花颗粒(G1)、复方金钱草颗粒(G2)、金菊五花茶颗粒

(G3)、感冒清热颗粒(G4)、清热祛湿颗粒(G5)、感冒止咳颗粒(G6)、当归调经颗粒(G7)、小儿解表颗粒(G8)、辛芩颗粒(G9)、安儿宁颗粒(G10)、上清丸(P1)、小活络丸(P2)、天王补心丸(P3)、辛夷鼻炎丸(P4)、华佗再造丸(P5)、防风通圣丸(P6)、十全大补丸(P7)、柏子养心丸(P8)、乌蛇止痒丸(P9)、补脾益肠丸(P10)、心脑康胶囊(C1)、平消胶囊(C2)、独一味胶囊(C3)、湿毒清胶囊(C4)、通便灵胶囊(C5)、金刚藤胶囊(C6)、桂枝茯苓胶囊(C7)、一清胶囊(C8)、连花清瘟胶囊(C9)、骨疏康胶囊(C10)、石淋通片(T1)、妇科千金片(T2)、野木瓜片(T3)、天麻首乌片(T4)、百合固金片(T5)、三金片(T6)、复明片(T7)、清热散结片(T8)、裸花紫珠片(T9)、七叶神安片(T10)共50种中成药购自广州地区不同的药店,所有这些药物的生产厂家均通过了GMP认证。

### 1.3 培养基

胰酪大豆胨琼脂、沙氏葡萄糖琼脂、胰酪大豆胨液体、沙氏葡萄糖液体、肠道菌增菌液体、紫红胆盐葡萄糖琼脂、木糖赖氨酸脱氧胆酸盐琼脂、麦康凯琼脂、麦康凯液体和RV沙门菌增菌液体(广东环凯微生物科技有限公司),适用性试验均符合中国药典2015年版的规定。

### 1.4 菌种

金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) [CMCC(B)26003]、大肠埃希菌(*Escherichia coli*) [CMCC(B)44102]、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) [CMCC(B)63501]、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*) [CMCC(B)10104]、乙型副伤寒沙门菌(*Salmonella paratyphi B*) [CMCC(B)50094]、白色念珠菌(*Candida albicans*) [CMCC(F)98001]和黑曲霉(*Aspergillus niger*) [CMCC(F)98003]均购自中国食品药品检定研究院。

## 2 方法

### 2.1 菌液的制备

#### 2.1.1 计数用金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、枯草芽孢杆菌菌悬液

取金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、枯草芽孢杆菌,分别接种至胰酪大豆胨液体培养基,30~35℃培养18~24h,作为新鲜培养物;分别取新鲜培养物,用0.9%无菌氯化钠溶液制成每1mL含菌量为 $10^3\sim 10^4$  cfu和每2mL含菌量为 $10^3\sim 10^4$  cfu的菌

悬液。

#### 2.1.2 计数用白色念珠菌悬液

取白色念珠菌,接种至沙氏葡萄糖液体培养基,20~25℃培养2~3d,作为新鲜培养物;取新鲜培养物,用0.9%无菌氯化钠溶液制成每1mL含菌量为 $10^3\sim 10^4$  cfu和每2mL含菌量为 $10^3\sim 10^4$  cfu的菌悬液。

#### 2.1.3 计数用黑曲霉孢子悬液

取黑曲霉,接种至沙氏葡萄糖琼脂斜面培养基,置20~25℃培养5~7d,加入0.9%无菌氯化钠溶液3~5mL,将孢子洗脱,作为孢子悬液。吸取孢子悬液至无菌试管内,用0.9%无菌氯化钠溶液制成每1mL含孢子量为 $10^3\sim 10^4$  cfu和每2mL含孢子量为 $10^3\sim 10^4$  cfu的黑曲霉孢子悬液。

#### 2.1.4 控制菌检查用大肠埃希菌、铜绿假单胞菌、沙门菌菌悬液

取大肠埃希菌、铜绿假单胞菌、沙门菌,分别接种至胰酪大豆胨液体培养基,30~35℃培养18~24h,作为新鲜培养物;取新鲜培养物,用0.9%无菌氯化钠溶液制成每1mL含菌量不大于100 cfu的菌悬液。

### 2.2 供试液制备

含药材原粉的制剂,稀释液用胰酪大豆胨液体培养基,不含药材原粉的制剂,稀释液用pH 7.0无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液。

口服溶液剂:取本品,混匀,作为供试液。颗粒剂:取本品10g,加稀释液至100mL,振摇使分散,摇匀,作为1:10供试液。胶囊剂:取本品10g,加稀释液至100mL,置45℃水浴使分散,混匀,作为1:10供试液。丸剂和片剂:取本品10g,加稀释液至100mL,用匀浆仪粉碎,摇匀,作为1:10供试液。

制备1:10、1:20、1:50、1:100和1:1000供试液时,取供试液或1:10供试液适量,用稀释液稀释制成所需稀释级。

### 2.3 计数方法适用性试验

#### 2.3.1 需氧菌总数

2.3.1.1 平皿法 取供试液或1:10或1:20或1:50或1:100供试液各10mL(必要时,静置5min,取上清液),分别置灭菌试管中,加入每1mL含菌量为 $10^3\sim 10^4$  cfu的各试验菌悬液0.1mL,使含菌量每1mL不大于100 cfu,摇匀,取1mL,置平皿中,

注入胰酪大豆胨琼脂培养基约 20 mL,待凝,置 30~35 °C 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。

**2.3.1.2 薄膜过滤法** 七叶神安片:①取 1:100 供试液,静置 5 min,取上清液 10 mL 于灭菌试管中,加入每 1 mL 含菌量为  $10^3\sim 10^4$  cfu 的各试验菌悬液 0.1 mL,使含菌量每 1 mL 不大于 100 cfu,摇匀,取 1 mL 注入 100 mL pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液中,过滤,用 pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液冲洗滤膜 8 次,每次 100 mL;②取 1:1 000 供试液,静置 5 min,取上清液 10 mL 于灭菌试管中,加入每 2 mL 含菌量为  $10^3\sim 10^4$  cfu 的各试验菌悬液 0.1 mL,使含菌量每 2 mL 不大于 100 cfu,摇匀,取 2 mL 注入 100 mL pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液中,过滤,用 pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液冲洗滤膜 2 次,每次 100 mL,滤干,取膜贴于胰酪大豆胨琼脂平板上,置 30~35 °C 培养,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。

裸花紫珠片:取 1:50 供试液,静置 5 min,取上清液 10 mL 于灭菌试管中,加入每 1 mL 含菌量为  $10^3\sim 10^4$  cfu 的各试验菌悬液 0.1 mL,使含菌量每 1 mL 不大于 100 cfu,摇匀,取 1 mL 注入 100 mL pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液中,过滤,用 pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液冲洗滤膜 2 次,每次 100 mL,滤干,取膜贴于胰酪大豆胨琼脂平板上,置 30~35 °C 培养,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。

### 2.3.2 霉菌和酵母菌总数

取供试液或 1:10 供试液各 10 mL,分别置灭菌试管中,加入每 1 mL 含菌量为  $10^3\sim 10^4$  cfu 的各试验菌悬液 0.1 mL,使含菌量每 1 mL 不大于 100 cfu,摇匀,取 1 mL,置平皿中,注入沙氏葡萄糖琼脂培养基约 20 mL,待凝,置 20~25 °C 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。

### 2.3.3 控制菌检查

耐胆盐革兰阴性菌:取“2.2”项中制备好的 1:10 供试液,20~25 °C 培养 2 h,作为预培养物,各取预培养物 1 mL,分别接种至 10 mL 肠道菌增菌液体培养基中,各加入每 1 mL 含菌量不大于 100 cfu 的

大肠埃希菌菌悬液和铜绿假单胞菌菌悬液 1 mL,30~35 °C 培养 24 h 后,划线接种于紫红胆盐葡萄糖琼脂培养基平板上,30~35 °C 培养 18~24 h。

大肠埃希菌:取 1:10 供试液 10 mL(颗粒剂、丸剂、片剂、胶囊剂)或供试液 1 mL(口服溶液剂),每 1 mL 含菌量不大于 100 cfu 的大肠埃希菌菌悬液 1 mL,接种至 100 mL 胰酪大豆胨液体培养基中,30~35 °C 培养 18~24 h,取上述培养物 1 mL 接种至 100 mL 麦康凯液体培养基中,42~44 °C 培养 24 h。取麦康凯液体培养物划线接种于麦康凯琼脂培养基平板上,30~35 °C 培养 18~24 h。

沙门菌:取供试品 10 g 或 10 mL,接种至表 3 中的含或不含 1% 聚山梨酯 80 的胰酪大豆胨液体培养基中,匀浆(丸剂、片剂)或置 45 °C 水浴振摇(胶囊剂)或摇匀(液体),30~35 °C 培养 18~24 h。取上述培养物 0.1 mL 接种至 RV 沙门增菌液体培养基 10 mL 中,30~35 °C 培养 18~24 h。取 RV 沙门增菌液体培养物划线接种于木糖赖氨酸脱氧胆酸盐琼脂培养基平板上,30~35 °C 培养 18~48 h。

### 2.3.4 计算

需氧菌总数和霉菌和酵母菌总数回收比值按如下公式计算:

各菌株回收比值 = (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

## 3 结果

计数方法适用性试验的结果判断为回收比值应在 0.5~2 范围内,控制菌检查适用性试验的结果判断为应能检出所加试验菌的相应反应特征。

### 3.1 需氧菌总数计数适用性试验结果

如表 1,口服溶液剂 1 种可以采用原液平皿法,剩下 9 种采用 1:10 平皿法检查;颗粒剂 9 种可以采用 1:10 平皿法,剩下 1 种采用 1:20 平皿法检查;10 种胶囊剂和 10 种丸剂全部均需稀释后再采用平皿法检查;片剂 3 种可采用 1:10 平皿法,5 种需稀释后采用平皿法,剩下 2 种则需要采用薄膜过滤法检查。

### 3.2 霉菌和酵母菌总数计数适用性试验结果

如表 2,颗粒剂、胶囊剂、片剂和丸剂均可用 1:10 供试液平皿法检查;口服液体制剂均可用供试品原液平皿法检查。

表 1 需氧菌验证回收率

Tab. 1 Recoveries of validation of aerobic bacteria

中成药 (CPT)	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
		O1	原液平皿法 (original solution plate)	0.5	0.6	0.9	0.9	0.9	1.1	0.9	1.0	0.6	0.9	1.1	1.0	1.3
O2	1:10 平皿法 (1:10 plate)	0.9	0.8	1.2	1.2	1.2	0.8	1.1	0.8	0.8	0.9	0.9	1.2	1.1	0.9	1.1
O3	1:10 平皿法 (1:10 plate)	0.9	1.2	0.9	0.8	0.8	0.9	1.0	1.0	0.8	1.0	0.8	0.8	1.0	0.9	0.8
O4	1:10 平皿法 (1:10 plate)	0.9	1.1	0.9	0.9	0.8	1.2	0.9	1.0	1.1	1.3	0.8	1.0	1.0	1.0	1.2
O5	1:10 平皿法 (1:10 plate)	1.0	0.8	1.2	0.9	0.9	1.0	0.8	0.9	0.8	1.0	1.3	1.1	1.0	1.1	0.8
O6	1:10 平皿法 (1:10 plate)	0.8	0.9	1.0	0.8	0.9	0.9	0.8	0.9	1.0	0.7	1.0	0.7	1.2	0.9	1.0
O7	1:10 平皿法 (1:10 plate)	0.7	0.9	1.1	0.9	1.2	0.9	0.9	0.9	0.8	0.9	1.0	0.9	1.0	1.1	1.0
O8	1:10 平皿法 (1:10 plate)	1.0	1.2	1.0	1.0	0.8	0.9	1.0	1.1	1.0	1.2	1.1	0.8	1.0	0.9	0.7
O9	1:10 平皿法 (1:10 plate)	0.7	1.2	1.0	0.7	1.0	1.0	1.0	1.3	0.8	0.9	0.8	0.8	0.9	1.1	1.1
O10	1:10 平皿法 (1:10 plate)	0.9	0.9	1.0	0.9	0.9	1.0	1.0	0.8	0.9	0.9	1.0	0.8	0.9	1.0	0.9
G1	1:10 平皿法 (1:10 plate)	1.0	0.7	0.8	0.9	0.9	1.0	0.6	0.9	0.8	1.1	0.8	1.0	0.9	1.0	0.9
G2	1:10 平皿法 (1:10 plate)	1.0	1.0	0.7	0.9	1.0	0.9	1.0	0.9	0.7	0.9	1.0	1.2	0.9	0.9	1.2
G3	1:10 平皿法 (1:10 plate)	0.9	0.9	0.6	1.0	1.2	0.6	0.9	0.9	0.7	0.9	1.1	1.0	0.8	1.1	1.2
G4	1:10 平皿法 (1:10 plate)	1.1	0.7	0.5	1.0	0.9	0.9	1.0	1.0	0.8	0.9	1.0	1.0	0.8	1.0	0.8
G5	1:10 平皿法 (1:10 plate)	1.2	0.9	0.8	0.9	0.9	0.6	1.1	0.8	0.6	0.9	0.7	1.2	1.1	0.8	0.9
G6	1:10 平皿法 (1:10 plate)	0.9	1.0	0.7	0.7	0.9	1.2	0.7	0.7	0.9	1.1	1.2	1.1	0.8	0.9	0.9
G7	1:10 平皿法 (1:10 plate)	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9	1.3	1.0	0.7	1.0	1.1	0.8	0.9	0.9	0.9
G8	1:10 平皿法 (1:10 plate)	1.2	1.2	0.8	0.8	0.8	1.2	0.9	0.8	0.7	1.2	0.9	0.8	1.1	0.8	0.8
G9	1:10 平皿法 (1:10 plate)	0.8	1.1	1.2	0.9	1.0	1.0	0.6	0.7	0.6	1.0	1.0	1.0	1.1	0.8	0.9
G10	1:20 平皿法 (1:20 plate)	1.0	0.8	0.9	0.7	1.1	1.1	0.8	1.1	0.9	1.3	1.1	0.9	0.9	1.0	1.0
P1	1:20 平皿法 (1:20 plate)	0.9	1.0	1.0	0.8	0.9	0.7	0.7	0.5	0.7	0.8	1.3	0.7	0.6	0.7	0.6
P2	1:50 平皿法 (1:50 plate)	1.1	0.6	1.1	0.8	0.9	1.1	0.6	0.7	0.9	0.7	0.9	1.0	0.6	0.9	1.0
P3	1:50 平皿法 (1:50 plate)	0.8	0.9	0.8	0.8	1.0	0.7	0.7	0.7	0.7	0.8	0.7	0.7	0.8	1.0	1.1
P4	1:50 平皿法 (1:50 plate)	1.0	0.8	0.9	1.0	0.9	0.9	0.6	0.6	1.1	1.0	0.8	1.1	0.8	1.0	0.9
P5	1:50 上清平皿法 (1:50 supernatant plate)	0.7	0.9	0.9	1.2	1.0	0.7	1.2	0.6	1.0	0.6	0.8	1.0	0.8	0.9	0.8
P6	1:50 平皿法 (1:50 plate)	0.8	0.6	0.8	0.8	0.9	0.9	0.8	0.6	0.7	0.7	1.0	1.2	1.1	0.7	0.8
P7	1:100 平皿法 (1:100 plate)	1.1	1.2	1.1	0.8	0.9	0.9	0.6	1.6	0.9	0.8	1.2	1.2	0.7	1.2	0.9
P8	1:100 平皿法 (1:100 plate)	1.0	0.9	1.0	0.9	0.9	1.0	0.5	0.9	1.1	0.8	0.8	1.0	1.0	1.1	1.0

表 1(续)

中成药 (CPT)	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
P9	1:100 上清平皿法 (1:100 supernatant plate)	0.8	0.8	1.1	0.9	1.0	0.8	1.1	0.6	0.5	0.7	1.1	1.0	1.1	1.0	0.8
P10	1:100 上清平皿法 (1:100 supernatant plate)	1.0	1.0	0.9	1.1	1.1	1.0	0.6	0.7	0.7	0.8	1.2	1.2	1.0	0.8	0.9
C1	1:20 平皿法 (1:20 plate)	1.2	0.6	0.7	0.7	0.9	0.7	0.5	0.5	1.2	1.0	0.8	0.6	0.9	1.0	1.0
C2	1:20 平皿法 (1:20 plate)	0.9	0.7	1.0	0.9	0.7	0.7	0.8	0.7	0.8	0.8	0.9	1.0	0.9	0.8	1.2
C3	1:20 平皿法 (1:20 plate)	0.7	0.8	0.5	0.8	0.9	0.8	0.6	0.7	1.3	0.9	1.2	0.8	0.9	1.1	0.8
C4	1:20 平皿法 (1:20 plate)	0.9	0.8	0.8	0.9	0.8	0.9	0.9	1.0	1.2	1.0	1.0	0.7	0.9	0.9	1.2
C5	1:20 平皿法 (1:20 plate)	0.9	1.2	0.7	0.8	0.7	0.8	1.1	1.0	0.8	0.9	1.0	1.0	0.9	1.0	0.6
C6	1:50 平皿法 (1:50 plate)	1.0	0.5	1.1	1.1	0.7	0.8	0.6	0.7	0.8	1.0	0.7	0.7	1.2	0.9	0.7
C7	1:50 上清平皿法 (1:50 supernatant plate)	0.7	0.8	1.0	0.9	1.0	1.0	0.7	1.1	0.7	0.8	0.9	1.1	1.3	0.8	0.9
C8	1:100 平皿法 (1:100 plate)	1.1	0.8	1.3	1.1	1.0	0.7	0.8	0.9	0.7	0.7	0.9	1.1	1.0	0.9	0.9
C9	1:100 平皿法 (1:100 plate)	0.9	0.8	0.9	0.9	1.0	1.0	0.9	0.6	0.8	0.8	0.7	1.1	1.3	0.8	1.1
C10	1:100 上清平皿法 (1:100 supernatant plate)	1.3	1.1	1.0	0.9	0.9	0.7	0.8	0.7	0.7	1.0	0.8	1.1	1.1	1.0	1.0
T1	1:10 平皿法 (1:10 plate)	1.1	0.6	0.6	0.6	1.1	0.9	1.1	1.2	0.8	1.1	0.8	1.1	0.7	1.1	0.9
T2	1:10 平皿法 (1:10 plate)	0.5	0.8	1.0	0.7	0.6	0.7	0.5	0.5	0.9	1.0	0.8	0.8	1.0	0.5	0.8
T3	1:10 平皿法 (1:10 plate)	0.7	0.8	0.8	0.6	0.7	1.0	0.5	0.8	0.5	0.8	1.1	0.6	0.9	0.9	1.1
T4	1:20 平皿法 (1:20 plate)	0.6	1.0	0.7	0.6	1.0	1.1	0.9	0.7	1.2	0.7	1.1	1.0	0.7	1.0	1.1
T5	1:20 平皿法 (1:20 plate)	1.0	0.6	0.7	1.0	0.9	0.5	0.9	0.7	1.2	1.2	0.9	0.7	1.0	0.8	0.5
T6	1:50 平皿法 (1:50 plate)	0.8	0.6	1.3	1.1	1.2	0.9	0.7	0.6	1.0	0.7	1.2	0.9	1.1	0.8	0.9
T7	1:50 平皿法 (1:50 plate)	1.1	1.0	0.8	0.9	0.6	0.9	0.7	0.8	1.0	0.8	0.9	1.1	0.8	0.9	0.7
T8	1:50 平皿法 (1:50 plate)	0.7	0.8	0.8	0.8	0.7	1.2	0.8	1.0	0.8	0.8	1.0	1.0	1.3	1.0	0.9
T9	1:50 冲 200 mL 薄膜过滤法 (1:50 dilute to 200 mL membrane filtration)	0.9	1.2	0.9	1.3	0.9	0.8	1.0	0.6	0.6	0.9	0.9	0.9	0.6	0.8	0.7
T10	1:100 冲 800 mL 薄膜过滤法 (1:100 dilute to 800 mL membrane filtration)	/	/	/	/	/	/	0	/	/	/	/	/	/	/	/
	1:1 000 冲 200 mL 薄膜过滤法 (1:1 000 dilute to 200 mL membrane filtration)	1.0	0.8	1.2	0.9	0.8	1.2	0.8	0.6	1.3	0.9	1.3	1.0	0.5	0.6	0.8

表 2 霉菌和酵母菌验证回收率

Tab. 2 Recoveries of validation of mycete and saccharomycetes

中成药 (CPT)	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
O1	原液平皿法 (original solution plate)	0.9	1.0	1.2	1.0	0.8	1.1
O2	原液平皿法 (original solution plate)	1.3	0.7	0.7	0.8	1.2	0.9
O3	原液平皿法 (original solution plate)	0.9	0.8	0.5	0.9	1.1	0.8
O4	原液平皿法 (original solution plate)	0.9	0.9	1.1	0.8	1.0	0.8
O5	原液平皿法 (original solution plate)	1.0	1.1	0.9	0.9	0.8	1.3
O6	原液平皿法 (original solution plate)	1.1	1.1	1.2	0.7	0.8	1.1
O7	原液平皿法 (original solution plate)	0.9	0.7	0.9	0.6	0.8	0.6
O8	原液平皿法 (original solution plate)	1.0	0.6	0.9	0.7	0.9	0.8
O9	原液平皿法 (original solution plate)	1.0	1.3	1.1	0.8	0.9	0.7
O10	原液平皿法 (original solution plate)	1.2	0.6	1.0	0.9	1.0	1.1
G1	1:10 平皿法 (1:10 plate)	0.9	1.1	1.2	0.9	0.9	1.0
G2	1:10 平皿法 (1:10 plate)	0.9	1.2	1.0	0.8	0.8	1.1
G3	1:10 平皿法 (1:10 plate)	0.8	1.0	0.8	0.9	0.9	1.0
G4	1:10 平皿法 (1:10 plate)	0.8	1.1	0.7	0.8	0.8	0.8
G5	1:10 平皿法 (1:10 plate)	1.0	1.2	0.9	1.2	0.8	1.0
G6	1:10 平皿法 (1:10 plate)	1.0	0.8	0.7	0.9	0.9	0.8
G7	1:10 平皿法 (1:10 plate)	0.9	1.1	0.8	1.0	1.1	1.0
G8	1:10 平皿法 (1:10 plate)	1.0	0.8	0.8	0.7	1.0	1.2
G9	1:10 平皿法 (1:10 plate)	1.0	1.2	0.9	0.9	1.0	0.5
G10	1:10 平皿法 (1:10 plate)	1.1	1.0	1.1	1.0	0.9	0.8
P1	1:10 平皿法 (1:10 plate)	0.7	1.1	0.9	0.5	1.1	0.9
P2	1:10 平皿法 (1:10 plate)	0.7	0.9	0.7	0.8	0.7	0.7
P3	1:10 平皿法 (1:10 plate)	1.1	0.8	0.9	1.1	0.7	0.7
P4	1:10 平皿法 (1:10 plate)	0.9	0.9	1.0	1.1	1.0	0.7
P5	1:10 平皿法 (1:10 plate)	0.9	0.9	0.8	0.8	0.8	0.8
P6	1:10 平皿法 (1:10 plate)	0.9	0.6	0.8	0.8	0.7	1.0
P7	1:10 平皿法 (1:10 plate)	1.0	1.1	1.0	0.9	1.3	0.6
P8	1:10 平皿法 (1:10 plate)	0.6	1.0	1.0	0.6	0.9	0.7
P9	1:10 平皿法 (1:10 plate)	1.1	0.9	1.1	1.2	1.2	0.7
P10	1:10 平皿法 (1:10 plate)	0.8	0.9	0.8	0.7	0.8	0.6
C1	1:10 平皿法 (1:10 plate)	0.9	0.9	1.2	1.3	0.6	0.7
C2	1:10 平皿法 (1:10 plate)	0.8	0.7	0.7	0.7	0.8	0.9
C3	1:10 平皿法 (1:10 plate)	0.9	1.0	1.0	1.0	0.7	0.8
C4	1:10 平皿法 (1:10 plate)	0.9	0.8	0.5	0.5	1.1	0.7
C5	1:10 平皿法 (1:10 plate)	1.1	0.9	1.2	0.9	1.1	0.7
C6	1:10 平皿法 (1:10 plate)	0.6	0.9	0.5	0.7	0.7	0.6
C7	1:10 平皿法 (1:10 plate)	0.8	0.9	1.0	0.6	1.0	1.1
C8	1:10 平皿法 (1:10 plate)	1.0	0.9	0.8	0.6	0.8	0.6

表 2(续)

中成药 (CPT)	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
C9	1:10 平皿法 (1:10 plate)	0.7	0.7	0.8	0.9	0.6	0.6
C10	1:10 平皿法 (1:10 plate)	0.8	1.0	0.9	0.7	1.1	0.9
T1	1:10 平皿法 (1:10 plate)	0.8	1.0	0.9	0.9	0.6	0.7
T2	1:10 平皿法 (1:10 plate)	1.0	0.5	1.1	0.8	0.8	0.7
T3	1:10 平皿法 (1:10 plate)	1.1	1.3	0.8	0.5	1.0	0.6
T4	1:10 平皿法 (1:10 plate)	0.8	1.0	1.0	0.7	0.7	0.7
T5	1:10 平皿法 (1:10 plate)	0.7	1.0	1.1	0.7	0.7	0.7
T6	1:10 平皿法 (1:10 plate)	0.8	1.1	0.8	0.9	1.0	0.6
T7	1:10 平皿法 (1:10 plate)	0.7	0.5	0.7	0.9	0.5	0.5
T8	1:10 平皿法 (1:10 plate)	0.8	0.5	0.7	0.5	0.6	0.7
T9	1:10 平皿法 (1:10 plate)	0.8	1.1	0.8	0.7	0.8	0.7
T10	1:10 平皿法 (1:10 plate)	0.8	0.5	0.9	1.1	1.2	1.2

### 3.3 控制菌检查适用性试验结果

如表 3,耐胆盐革兰氏阴性菌除湿毒清胶囊接种至 20 mL 的肠道菌增菌液体培养基中检查,其他均可接种至 10 mL 的肠道菌增菌液体培养基中检查;大肠埃希菌均可接种至 100 mL 的胰酪大豆胨液体培养基中检查;沙门菌检查中,牛黄蛇胆川贝液、小儿消积止咳口服液、小儿解表颗粒、上清丸、小活络丸、天王补心丸、辛夷鼻炎丸、防风通圣丸、柏子养心丸、补脾益

肠丸、心脑康胶囊、通便灵胶囊、妇科千金片、天麻首乌片、百合固金片和复明片可接种至 100 mL 的胰酪大豆胨液体培养基中检查,华佗再造丸、乌蛇止痒丸、湿毒清胶囊和桂枝茯苓胶囊可接种至 200 mL 的胰酪大豆胨液体培养基中检查,安儿宁颗粒和十全大补丸可接种至 100 mL 的含 1% 聚山梨酯 80 的胰酪大豆胨液体培养基中检查,而平消胶囊可接种至 300 mL 的含 1% 聚山梨酯 80 的胰酪大豆胨液体培养基中检查。

表 3 控制菌检查验证结果

Tab. 3 Results of validation of control bacteria

中成药 (CPT)	培养基体积 (volume of culture media)		
	耐胆盐革兰氏阴性菌 (bile-tolerant gram negative bacteria)	大肠埃希菌 ( <i>E. coli</i> )	沙门菌 ( <i>Salmonella</i> )
O1, O3, O4, O5, O6, O7, O9, O10, G1, G2, G3, G4, G5, G6, G7, G9, C3, C4, C6, C8, C9, C10, T1, T3, T6, T8, T9, T10	无需检测 (no detect)	100 mL	无需检测 (no detect)
O8	无需检测 (no detect)	100 mL	100 mL
O2, G8, P1, P2, P3, P4, P6, P8, P10, C1, C5, T2, T4, T5, T7	10 mL	100 mL	100 mL
P5, P9, C7	10 mL	100 mL	200 mL
C4	20 mL	100 mL	200 mL
G10, P7	10 mL	100 mL	含 1% 聚山梨酯 80, 100 mL (containing 1% Polysorbate 80, 100 mL)
C2	10 mL	100 mL	含 1% 聚山梨酯 80, 300 mL (containing 1% Polysorbate 80, 300 mL)



#### 4 讨论

口服溶液剂容易变质,不易保存,一般含防腐剂,用供试品原液做需氧菌总数的回收时,回收比值通常达不到 0.5,将供试品原液稀释 10 倍,可消除其抑菌性,故在考虑检验成本、操作是否简便、快速等方面,口服溶液剂如原液的需氧菌总数回收达不到 0.5,可考虑直接用 1:10 供试液进行计数方法适用性试验。

需氧菌总数计数:所研究的 10 种口服溶液剂 1 种可以采用原液平皿法检查,剩余 9 种均可以采用 1:10 平皿法检查;所研究的 10 种颗粒剂 9 种可以采用 1:10 平皿法检查,剩余 1 种 1:20 平皿法检查。总体而言,中成药口服溶液剂和颗粒剂的抑菌性均较弱,这可能是由于这 2 种剂型中成药的辅料较多且含量较高,活性成分的含量相对较低造成的。由于中成药口服溶液剂和颗粒剂的抑菌性一般较小,在大多数情况下,需氧菌总数可以采用低稀释级平皿法检查。尽管小儿解表颗粒、复方金银花颗粒、感冒止咳颗粒、可感利咽口服液、清开灵口服液、清热解毒口服液等药物包含了金银花、山银花、连翘和黄芩等含抑菌作用较为明显的成分,但从表 1 的实验结果可知,这些中成药的需氧菌总数均可采用 1:10 供试液做计数方法,由此也证明了它们每单位(g 或 mL)的活性成分含量可能较低。

需氧菌总数计数:所研究的 10 种丸剂和 10 种胶囊剂均需稀释后再采用平皿法检查。总体而言,这 2 种剂型的中成药抑菌作用比较明显,这可能跟其抑菌作用活性成分的含量较高有关。

需氧菌总数计数:所研究的 10 种片剂中,3 种可采用 1:10 平皿法检查,5 种需稀释后再采用平皿法检查,剩下的七叶神安片和裸花紫珠片这 2 种采用总提取物或浸膏制备的中成药,由于其抗菌作用的活性成分含量很高,需要采用薄膜过滤法检查。总体而言,中成药片剂的抑菌性无明显规律,有些组分的抑菌作用很弱,而有些组分的抑菌作用则很强,这与片剂组方变化较大因素有关,微生物检验时需要根据实际情况采用不同稀释级的平皿法或薄膜过滤法检测。

小活络丸、华佗再造丸、平消胶囊、桂枝茯苓胶囊、心脑康胶囊和独一味胶囊这类具有活血化瘀,止痛的功效的中成药;上清丸、防风通圣丸、辛夷鼻炎丸、一清胶囊、莲花清瘟胶囊、金刚藤胶囊、三金片和裸花紫珠片这类具有清热解毒功效的中成药。从表

1 结果也可以看出,这两类药物均呈现出一定的抑菌性,可采用稀释和薄膜过滤法消除其抑菌性。独一味胶囊、金刚藤胶囊、清热散结片、野木瓜片、石淋通片、七叶神安片和裸花紫珠片均为单方制剂,处方分别是独一味、金刚藤、千里光、野木瓜、广金钱草、三七叶总皂苷及裸花紫珠干浸膏,由表 1 结果可以大致推测,独一味、金刚藤、千里光、野木瓜和广金钱草的抗菌性较弱,而三七叶总皂苷和裸花紫珠干浸膏的抗菌性很强。

需氧菌总数计数:七叶神安片采用 1:100 供试液进行薄膜过滤法试验,冲洗量为 800 mL,枯草芽孢杆菌的回收比值为 0,表明本品对枯草芽孢杆菌有很强的抑菌性,故将供试液往更高稀释级稀释。当采用 1:1 000 供试液进行薄膜过滤法试验,冲洗量为 200 mL,即可很好地去其抑菌性。

所研究的 50 种中成药的霉菌和酵母菌总数均可以采用原液或最低稀释级平皿法检测,由此可见,中成药对白色念珠菌和黑曲霉基本没有抑菌作用。

本文研究中还发现,含有抑菌成分的中成药,一般对金黄色葡萄球菌和枯草芽孢杆菌有抑菌作用,故怀疑有抑菌成分时,可先采用金黄色葡萄球菌和枯草芽孢杆菌作为敏感菌株,以减少工作量,提高工作效率。

检查沙门菌时,会常遇到对沙门菌抑菌性强的供试品。并且,由于中成药丸剂和片剂的颗粒较多,使供试液本身难以过滤,很难通过薄膜过滤法消除抑菌成分。但实验发现,在胰酪大豆胨液体培养基中加入适量的聚山梨酯 80,可中和其抑菌性,并可减少培养基体积,提高检验效率及检出率。

黑曲霉在胰酪大豆胨琼脂平板和沙氏葡萄糖琼脂平板上生长会形成的较大菌落。为避免菌落生长过大连成片无法计数,胰酪大豆胨琼脂平板应在培养 2 d 开始计数,沙氏葡萄糖琼脂平板应在培养 3 d 开始计数,并逐日计数。

中国药典 2015 年版不再收载“离心沉淀法”来去除供试品的抗菌活性,也有文献<sup>[16]</sup>报道离心沉淀处理对微生物限度检查结果会产生影响。故本实验遇到抗菌活性强的供试品,使用了自然沉淀的方法,静置的时间为 5 min,能有效地把颗粒度较大的药渣去除,并不对微生物有损伤,且取计数方法适用性试验的实验菌液同法操作,各菌株的菌落数与菌液对

照组的菌落数的比值达到 0.5 以上,表明此方法简单可行。

#### 参考文献

- [ 1 ] LAI YH, SO PK, LO SCL, *et al.* Rapid differentiation of Panax ginseng and Panax quinquefolius by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry [ J ]. *Anal Chim Acta*, 2012, 753: 73
- [ 2 ] YANG YY, DENG JW, YAO ZP. Field-induced wooden-tip electrospray ionization mass spectrometry for high-throughput analysis of herbal medicines [ J ]. *Anal Chim Acta*, 2015, 887: 127
- [ 3 ] YANG YY, DENG JW. Analysis of pharmaceutical products and herbal medicines using ambient mass spectrometry [ J ]. *Trends Anal Chem*, 2016, 82: 68
- [ 4 ] World Health Organization. General Guidelines for Methodologies on Research and Evaluation of Traditional Medicine [ M ]. Geneva: World Health Organization, 2000
- [ 5 ] LI P, QI LW, LIU EH, *et al.* Analysis of Chinese herbal medicines with holistic approaches and integrated evaluation models [ J ]. *Trends Anal Chem*, 2008, 27 ( 1 ): 66
- [ 6 ] 钱兴利. 探讨中国中成药出口发展存在的问题及对策 [ D ]. 北京: 对外经济贸易大学, 2006  
QIAN XL. Export of Chinese Traditional Patent Medicine: Issues and Approaches [ D ]. Beijing: University of International Business and Economics, 2006
- [ 7 ] ZHANG XL, JIA B, HUANG KK, *et al.* Tracing origins of complex pharmaceutical preparations using surface desorption atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry [ J ]. *Anal Chem*, 2010, 82 ( 19 ): 8060
- [ 8 ] YANG YY, DENG JW, YAO ZP. Pharmaceutical analysis by solid-substrate electrospray ionization mass spectrometry with wooden tips [ J ]. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2014, 25 ( 1 ): 37
- [ 9 ] 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  
HU CQ. Current situation and trend in pharmaceutical microbial control [ J ]. *Chin Pharm J*, 2015, 50 ( 20 ): 1747
- [ 10 ] 宋勤, 杜平华. 中成药微生物限度检查方法的探讨 [ J ]. *中国药事*, 2006, 20 ( 1 ): 46  
SONG Q, DU PH. Study on microbial limit test method for Chinese patent medicine [ J ]. *Chin Pharm Aff*, 2006, 20 ( 1 ): 46
- [ 11 ] 陈志禹, 夏佳, 席时东. 八珍丸的中国药典 2015 年版微生物学检查结果分析与评价 [ J ]. *药物分析杂志*, 2016, 36 ( 3 ): 418  
CHEN ZY, XIA J, XI SD. Result analysis and evaluation of microbiological examination of Bazhen pills by ChP 2015 method [ J ]. *Chin J Pharm Anal*, 2016, 36 ( 3 ): 418
- [ 12 ] 陈志禹, 夏佳, 席时东. 八珍系列制剂微生物限度检查法的建立及检验结果分析 [ J ]. *药物分析杂志*, 2016, 36 ( 4 ): 739  
CHEN ZY, XIA J, XI SD. Establishment of microbial limit test for Bazhen preparations and analysis of the test results [ J ]. *Chin J Pharm Anal*, 2016, 36 ( 4 ): 739
- [ 13 ] 杨晓莉, 李辉, 马英英, 等. 中国药典 2015 年版非无菌产品微生物限度检查: 微生物计数法解读 [ J ]. *药物分析杂志*, 2016, 36 ( 6 ): 1101  
YANG XL, LI H, MA YY, *et al.* Interpretation of the microbiological examination of nonsterile products: microbial enumeration test of Chinese pharmacopoeia 2015 edition [ J ]. *Chin J Pharm Anal*, 2016, 36 ( 6 ): 1101
- [ 14 ] 杨晓莉, 李辉, 马英英, 等. 中国药典 2015 年版非无菌产品微生物限度检查: 控制菌检查法解读与对策. *中国药师*, 2016, 19 ( 4 ): 748  
YANG XL, LI H, MA YY, *et al.* Interpretation and countermeasure of the microbiological examination for nonsterile products: test for specified microorganisms in Chinese pharmacopoeia ( 2015 edition ) [ J ]. *China Pharm*, 2016, 19 ( 4 ): 748
- [ 15 ] 中国药典 2015 年版. 四部 [ S ]. 2015: 附录 140  
ChP 2015. Vol IV [ S ]. 2015: Appendix 140
- [ 16 ] 张光华, 郑小敬, 余立. 离心弃沉淀处理对药品微生物限度检查结果影响的考察 [ J ]. *中国药物应用与监测*, 2007, 4 ( 2 ): 42  
ZHANG GH, ZHENG XJ, YU L. The study on the results of microbial limit test after centrifugation [ J ]. *Chin J Drug Appl Monit*, 2007, 4 ( 2 ): 42

( 本文于 2016 年 12 月 20 日收到 )