

## 10 种中药制剂微生物限度检查方法学的验证

莫小林<sup>1</sup>, 伍小燕<sup>1\*</sup>, 韦振源<sup>1</sup>, 陈晓明<sup>1</sup>, 韦涛<sup>2</sup>

(1. 广西中医学院第一附属医院, 南宁 530023; 2. 广西壮族自治区食品药品检验所, 南宁 530021)

**[摘要]** 目的: 建立 10 种中药制剂的微生物限度检查方法。方法: 按照《中国药典》2010 年版的规定, 对 10 种中药制剂进行微生物限度检查方法的验证。结果: 按供试品制备方法, 各试验菌样品的回收率均达到 70%。结论: 慢咽合剂、过敏性鼻炎合剂、生发乌发合剂、咽痒咳合剂可用常规法检查; 调脂口服液、消斑合剂、固卫合剂、健脾平肝合剂、鼻窦炎合剂可用培养基稀释法检查; 毒结清口服液可用薄膜过滤法检查。各品种控制菌检查均可用常规法检出。

**[关键词]** 中药制剂; 微生物限度检查; 方法验证; 抑菌作用

**[中图分类号]** R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)13-0056-04

## Verification of Microbial Limit Test Method for 10 Kinds of Traditional Chinese Medicine Preparations

MO Xiao-lin<sup>1</sup>, WU Xiao-yan<sup>1\*</sup>, WEI Zhen-yuan<sup>1</sup>, CHEN Xiao-ming<sup>1</sup>, WEI Tao<sup>2</sup>

(1. First Affiliated Hospital of Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530023, China;

2. Guangxi Institute for Food and Drug Control, Nanning 530021, China)

**[Abstract]** **Objective:** To establish microbial limit test method for 10 kinds of traditional Chinese medicine preparations. **Method:** According to the rules of the 2010 edition 'Chinese Pharmacopoeia', microbial limit test method for 10 kinds of traditional Chinese medicine preparations were verified. **Result:** According to sample preparation method, recovery rate of each test bacteria samples was up to 70%. **Conclusion:** Manyan mixture, allergic rhinitis mixture, germinal UFA mixture and Yanyangke mixture could use conventional method for detecting; Tiaozhi oral liquid, Xiaoban mixture, Guwei mixture, Jianpi Pinggan mixture and nasosinusitis mixture could take culture medium dilution method for inspection; Dujieqing oral liquid could check by membrane filtration method. All varieties of control bacteria examination could be detected by conventional method.

**[Key words]** traditional Chinese medicine preparation; microbial limit test; method validation; antibacterial effect

微生物限度检查法系检查非规定灭菌制剂及其原料、辅料受微生物污染程度的方法。检查项目包括细菌数、霉菌数、酵母菌数及控制菌检查<sup>[1]</sup>。按《中国药典》2010 年版要求, 对我院制剂室生产的 10 种中药制剂进行微生物限度检查方法的验证, 通

过供试液制备方法和不同的微生物检测方法, 优选出适合各制剂的微生物限度检查方法, 保证检验结果的准确性和可靠性。

### 1 材料

鼻窦炎合剂(批号 20110119, 20110215, 20110304), 调脂口服液(批号 20110217, 20110301, 20110402), 生发乌发合剂(批号 20110120, 20110222, 20110323), 消斑合剂(批号 20110122, 20110315, 20110418), 毒结清口服液(批号 20110412, 20110423, 20110506), 健脾平肝合剂(批号 20110306, 20110325, 20110410), 慢咽合剂(批号 20110111, 20110220, 20110309), 过敏性鼻炎合剂

**[收稿日期]** 20120205(007)

**[第一作者]** 莫小林, 学士, 主管中药师, 从事制剂开发和质量标准研究, Tel: 0771-5645433, E-mail: moxiaolin@163.com

**[通讯作者]** \* 伍小燕, 学士, 主任中药师, 从事中药鉴定和质量标准研究, Tel: 0771-5848631, E-mail: yxbwxy@163.com

(批号 20110418, 20110509, 20110523), 固卫合剂(批号 20110518, 20110607, 20110612), 咽痒咳合剂(批号 20110413, 20110525, 20110617) 以上制剂均由广西中医学院第一附属医院制剂室提供。

营养肉汤培养基(批号 100909), 营养琼脂培养基(批号 110219), 改良马丁琼脂培养基(批号 100326), 改良马丁培养基(批号 110107), 甘露醇氯化钠琼脂培养基(批号 101014), 玫瑰红钠琼脂培养基(批号 1100212), 溴化十六烷基三甲铵琼脂培养基(批号 101029), 胆盐乳糖培养基(批号 100919), 4-甲基伞形酮葡萄糖苷酸(MUG)培养基(批号 101022), pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液(批号 100903), 0.9% 无菌氯化钠溶液(批号 101121), 以上培养基和稀释液均为北京陆桥技术有限公司产品。

金黄色葡萄球菌[CMCC(B)26003], 大肠埃希菌[CMCC(B)44102], 白色念珠菌[CMCC(F)98001], 枯草芽孢杆菌[CMCC(B)63501], 黑曲霉菌[CMCC(F)98003], 铜绿假单胞菌[CMCC(B)10104]均由中国药品生物制品检定所提供。

洁净工作台(苏净集团苏州安泰空气技术有限公司), 立式压力蒸气灭菌器(上海申安医疗器械厂), ACS-6 型高精度电子计重秤(浙江君凯顺工贸有限公司), SPX-250B-III 型生化培养箱(上海跃进医疗器械有限公司), MJ-160B 型霉菌培养箱(上海跃进医疗器械厂), ZW-600 型微生物限度过滤系统(温州维科生物实验设备有限公司)。

## 2 方法与结果

**2.1 菌液制备** 取金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、枯草芽孢杆菌分别接种于 10 mL 营养肉汤培养基中, 在 35 °C 中培养 18 ~ 24 h。取上述新鲜培养物 1 mL, 用 0.9% 无菌氯化钠溶液稀释成细菌数 50 ~ 100 cfu·mL<sup>-1</sup> 的菌悬液, 备用。取白色念珠菌接种于 10 mL 改良马丁培养基中, 于 25 °C 培养 24 ~ 48 h。取上述新鲜培养物 1 mL, 用 0.9% 无菌氯化钠溶液稀释至细菌数 50 ~ 100 cfu·mL<sup>-1</sup> 的菌悬液, 备用。接种黑曲霉的新鲜培养物于改良马丁琼脂斜面培养基上, 25 °C 培养 5 ~ 7 d 至大量孢子产生, 加 0.9% 无菌氯化钠溶液 10 mL 将孢子洗脱, 加入蒙有灭菌纱布的无菌试管中。取此孢子悬液 1 mL, 用 0.9% 无菌氯化钠溶液稀释至 50 ~ 100 cfu·mL<sup>-1</sup> 的菌悬液, 备用。

**2.2 供试液制备** 样品各取 10 mL, 加入 pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液 100 mL, 混匀, 备用。

## 2.3 细菌、霉菌、酵母菌计数方法验证

**2.3.1 常规法** 采用 1 mL/皿的供试液, 加入 15 mL 琼脂培养基中, 分别测定金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、枯草芽孢杆菌、白色念珠菌、黑曲霉菌的菌落数。

**2.3.2 培养基稀释法** 采用 0.5 mL/皿和 0.2 mL/皿的供试液, 加入 15 mL 琼脂培养基中, 分别测定金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、枯草芽孢杆菌、白色念珠菌、黑曲霉菌的菌落数。

### 2.3.3 薄膜过滤法

**2.3.3.1 试验组** 取供试液 1 mL 加入过滤器内, 用 pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液冲洗滤膜 3 次, 每次 100 mL, 在最后 1 次的冲洗液中分别加入 2.1 项下的金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、枯草芽孢杆菌、白色念珠菌、黑曲霉菌菌液 (50 ~ 100 cfu·mL<sup>-1</sup>) 1 mL, 平行 2 张滤膜, 过滤后取滤膜, 将其贴于相应培养基上培养, 按菌落计数方法测定菌落数。

**2.3.3.2 菌液组** 分别取金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、枯草芽孢杆菌、白色念珠菌、黑曲霉菌菌液 1 mL 注入平皿中, 倾注相应的培养基, 平行制备 2 个平皿, 测定加入的菌落数。

**2.3.3.3 供试品对照组** 按试验组的方法操作, 不加菌液, 测定供试液的本底菌数。

**2.3.3.4 稀释剂对照组** 取 pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液加入过滤器内, 冲洗滤膜 3 次, 每次 100 mL, 在最后 1 次的冲洗液中分别加入 2.1 项下金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、枯草芽孢杆菌、白色念珠菌、黑曲霉菌菌液 (50 ~ 100 cfu·mL<sup>-1</sup>) 1 mL, 平行 2 张滤膜, 过滤后取滤膜, 将其贴于相应培养基上培养, 按菌落计数方法测定菌落数。

## 2.4 大肠埃希菌验证

**2.4.1 试验组** 取各品种供试液 10 mL 及大肠埃希菌 10 ~ 100 cfu 加入 100 mL 的胆盐乳糖培养基中培养 24 h。分别取上述培养液各 0.2 mL, 接种至 5 mL MUG 培养基管内培养, 分别于 5, 24 h 置 366 nm 紫外光下, 观察后, 沿培养管的管壁加入靛基质试液数滴, 观察有无玫瑰红色产生。

**2.4.2 阳性对照组** 按试验组的方法操作, 不加供试液, 阳性对照应为 MUG 阳性, 靛基质阳性。

**2.4.3 阴性对照组** 取稀释液 10 mL, 按试验组的方法操作, 不加菌液, 阴性对照应为 MUG 阴性和靛基质阴性。

**2.5 回收率计算** 各样品回收率结果见表 1 ~ 4。

表 1 常规法测定 10 种中药制剂对各试验菌株的回收率均值

%

供试品	大肠埃希菌			枯草杆菌			金黄色葡萄球菌			白色念珠菌			黑曲霉		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
鼻窦炎合剂	85.7	90.0	95.6	87.6	86.5	83.4	66.7	57.2	70.5	72.5	54.8	69.0	77.6	82.5	74.9
调脂口服液	76.8	87.2	84.0	78.9	80.2	84.7	64.7	68.6	54.3	58.5	64.1	67.0	74.2	79.5	73.2
生发乌发合剂	78.1	86.6	92.4	80.3	84.5	87.3	71.4	75.6	78.8	76.5	74.8	83.3	87.6	80.1	79.4
消斑合剂	79.6	77.4	80.1	73.7	70.9	74.5	60.3	58.7	62.7	67.0	70.1	59.1	76.2	74.1	78.0
毒结清口服液	73.8	70.4	74.2	65.7	60.3	58.2	25.6	48.2	33.0	54.1	48.7	53.2	62.5	54.6	50.4
健脾平肝合剂	90.6	87.4	82.8	76.9	87.1	90.7	52.4	66.7	42.1	70.4	70.0	94.2	74.1	72.5	82.1
慢咽合剂	72.5	81.2	77.6	75.9	76.6	84.5	84.0	77.8	86.9	90.8	88.1	82.6	82.1	79.6	75.4
过敏性鼻炎合剂	88.1	82.2	84.5	84.6	79.8	87.1	75.2	70.5	76.3	74.5	78.0	71.2	80.7	82.6	81.5
固卫合剂	88.1	92.4	84.3	70.1	76.8	84.0	66.7	51.2	66.6	63.4	75.6	67.1	77.4	80.4	76.2
咽痒咳合剂	83.2	89.7	92.1	84.0	76.8	85.8	70.7	73.8	82.4	77.9	78.2	74.1	73.5	85.5	87.1

表 2 培养基稀释度(0.5 mL/皿)法对各试验菌株的回收率均值

%

供试品	枯草杆菌			金黄色葡萄球菌			白色念珠菌			黑曲霉		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
鼻窦炎合剂	-	-	-	74.3	72.8	84.6	94.5	86.1	77.0	-	-	-
调脂口服液	-	-	-	83.3	89.0	79.4	86.5	90.3	79.6	-	-	-
消斑合剂	-	-	-	76.8	80.5	87.1	89.2	91.2	85.4	-	-	-
毒结清口服液	72.6	77.4	70.5	56.9	62.7	49.8	61.2	53.8	57.9	66.5	64.3	61.2
健脾平肝合剂	-	-	-	68.3	64.5	66.9	-	-	-	-	-	-
固卫合剂	-	-	-	86.7	94.3	82.6	84.9	77.5	82.8	-	-	-

表 3 培养基稀释度(0.2 mL/皿)法对各试验菌株的回收率均值

%

供试品	金黄色葡萄球菌			白色念珠菌			黑曲霉		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
毒结清口服液	67.9	68.0	70.4	68.5	64.7	69.3	79.6	75.4	80.3
健脾平肝合剂	87.0	93.2	88.1	-	-	-	-	-	-

表 4 毒结清口服液薄膜过滤法菌落计数及回收率测定

菌种	批号	平均菌落计数/CFU·mL <sup>-1</sup>				回收率/%	
		试验组	菌液组	供试品对照组	稀释剂对照组	试验组菌	稀释剂对照组菌
金黄色葡萄球菌	20110412	57	80	0	75	71.3	93.8
	20110423	66	83	0	72	79.5	86.7
	20110506	52	64	0	60	81.3	93.8
白色念珠菌	20110412	79	92	0	80	85.7	87.0
	20110423	85	98	0	90	86.7	91.8
	20110506	63	85	0	79	74.1	92.9

稀释剂对照组菌回收率 = 稀释剂对照组平均菌落数 / 菌液组平均菌落数 × 100%

试验组菌回收率 = (试验组平均菌落数 - 供试品平均菌落数) / 菌液组平均菌落数 × 100%

由表 1 结果可知,用常规法检查,慢咽合剂、过

敏性鼻炎合剂、生发乌发合剂、咽痒咳合剂 3 个批次对 5 个菌株的回收率均高于 70%,证明无抑菌作用,可直接用常规法检查;调脂口服液、消斑合剂、固卫合剂、健脾平肝合剂、鼻窦炎合剂具有不同程度的抑菌作用;毒结清口服液抑菌作用最强。

由表2,3结果可知,调脂口服液、消斑合剂、固卫合剂、健脾平肝合剂、鼻窦炎合剂用培养基稀释法可消除其抑菌作用,其中健脾平肝合剂需稀释成0.2 mL/皿其抑菌作用才可忽略不计。

毒结清口服液抑菌作用较强,用培养基稀释法不能消除其抑菌作用,改用薄膜过滤法进行检查,结果见表4,各菌的回收率均>70%,说明毒结清口服液可用该法进行细菌、霉菌及酵母菌计数。

按2.4项下的控制菌检查方法进行验证,各制剂品种试验组均为MUG阳性,靛基质阳性;阳性对照为MUG阳性,靛基质阳性;阴性对照为MUG阴性和靛基质阴性。提示以上10种中药制剂控制菌检查均可按常规方法进行。

### 3 讨论

药品中微生物检查结果受许多因素的影响,中药制剂由于原料来源不同、生产工艺的差别、使用的辅料不同以及生产过程中加入抑菌剂或防腐剂等原因,使生产的不同药品,甚至同一产品不同批次的药品对同1种微生物检查结果不同。在进行微生物检验时,只有在该检测条件下的样品浓度不足以抑制污染微生物的生长,使供试品中污染的微生物得以真实反映。因此,药品的微生物限度检查也应证明所采用的方法是适宜的,确认所采用的方法适合于样品的微生物污染的检查,方可使用<sup>[2]</sup>。

中药制剂多为含有多种成分的复方制剂,必须采取合适的试验方法去除药物的抑菌作用,才能真实反映药物受污染的程度<sup>[3-4]</sup>。由本试验结果可知,对无抑菌作用的制剂可用常规法进行检查;对抑菌作用较弱的制剂,可通过稀释培养基来消除其抑

菌活性;毒结清口服液抑菌作用最强,其中含有的猫爪草对金黄色葡萄球菌、白色念珠菌、四链球菌、痢疾杆菌等均有抑制作用<sup>[5]</sup>;含有的少棘蜈蚣对革兰阳性菌 *B. subtilis*、*Sta. aureus* 和 *Str. pyogenes* 及革兰阴性菌 *E. coli*、*Ps. aeruginosa* 和 *Shi. dysenteriae* 以及真菌 *Sa. cerevisiae*、*Asp. niger* 和 *M. bacilliformis* 均有抑菌斑产生,提示其具有广谱抗菌性<sup>[6]</sup>。采用薄膜过滤法可消除其抑菌作用,各菌回收率均>70%,故此法可用于毒结清口服液细菌、霉菌及酵母菌的微生物限度检查。通过方法学验证试验,能有效地消除制剂中的抑菌作用,保证试验结果的科学性和准确性,从而保证人民群众的用药安全、有效。

### [参考文献]

- [1] 中国药典. 一部[S]. 2010:附录XII C.
- [2] 曹雄伟. 最新药品微生物检验方法与操作标准规范及无菌隔离技术实用手册. 上卷[S]. 北京:中国中医药出版社,2009:261.
- [3] 陈华龙,王莉蓓,谭莉萍. 姜胆咳喘片微生物限度检查方法的验证[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(11):67.
- [4] 熊青,李香斌,谭小辉. 仙阳壮肾胶囊微生物限度检查的方法学验证[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(22):86.
- [5] 潘兆惠. 青蒿、猫爪草对耐药性结核杆菌抑菌作用观察[J]. 中医药信息,1986(5):26.
- [6] 任文华,张双全,宋大祥,等. 少棘蜈蚣水提取物的抗菌活性[J]. 中药材,2007,30(1):10.

[责任编辑 仝燕]