

蒲地蓝消炎片微生物限度检查方法的建立 及检验结果分析*

林吉恒, 彭志兰, 吴纤榛

(舟山市食品药品检验检测研究院, 舟山 316012)

摘要 目的:建立蒲地蓝消炎片微生物限度检查法,并对14个生产企业59批次产品的微生物限度检查结果进行分析。**方法:**按照《中国药典》2015年版对14家生产企业59批次的蒲地蓝消炎片进行微生物限度检查,细菌鉴定采用MALDI-TOF MS及VITEK 2全自动细菌鉴定试验系统。**结果:**需氧菌、霉菌和酵母菌计数方法适用性试验中各试验菌的回收率均为0.5~2.0;在控制菌检查方法适用性试验中,大肠埃希菌检查阳性对照组和供试品对照组检出大肠埃希菌;耐胆盐革兰阴性菌检查阳性对照组和供试品对照组检出大肠埃希菌和铜绿假单胞菌;沙门菌检查阳性对照组和供试品对照组检出沙门菌。样品主要污染的微生物是阴沟肠杆菌和其他环境常见污染菌。**结论:**建立蒲地蓝消炎片的微生物限度检查方法,14个生产企业59批次的微生物限度检查结果均符合规定。

关键词:蒲地蓝消炎片;微生物限度检查;方法适用性

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?

Establishment of microbial limit test method for Pudilan Xiaoyan Tablets and analysis on the test results*

LIN Jiheng, PENG Zhilan, WU Qiansu

(Zhoushan Institute for Food and Drug Control, Zhoushan 316012, China)

Abstract Objective: To establish the microbial limit test method for Pudilan Xiaoyan tablets, and analyze the test results of 59 batches from 14 manufacturers. **Methods:** The microbial limit test of 59 batches of Pudilan Xiaoyan Tablets from 14 manufacturers was conducted by ChP 2015. The bacterial strains were identified with MALDI-TOF MS and VITEK2 COMPACT 30. **Results:** The recoveries of all kinds of test bacteria in the suitability tests of total aerobic microbial count, yeast and mold count were 0.5~2.0. *Escherichia coli* was detected in the positive control group and test control group of the control bacteria suitability test. *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* were detected in the positive control group and test control group of bile-tolerant gram-negative bacteria test. *Salmonella paratyphi B* was detected in the positive control group and test control group of *Salmonella enterica* test. The main contaminant bacteria were *Enterobacter cloacae* and other bacteria related to the environment. **Conclusion:** It is satisfactory that the results of microbial limit tests of 59 batches of Pudilan Xiaoyan tablets from 14 manufacturers meet test requirements.

Key words: Pudilan Xiaoyan Tablets; microbial limit test; suitability of method

中成药是指以中药材为原料,在中医理论的指导下,按规定处方和标准制成一定剂型的现代药物,是现今最为常见的中药制剂。因其具有药效作用佳,副作用小,价格便宜等被人们所认可并广泛应用,同时,其作用、疗效、安全性等问题也成为了社会关注的焦点^[1]。药品检验是目前保证药物质量和安全性的一个有效手段,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^[2-3]。

蒲地蓝消炎片为卫生部药品标准《中药成方制剂》第三册收录的品种。由黄芩、蒲公英、苦地丁、板蓝根四味中药按比例组成,具有清热解毒、抗炎消肿的功效,主要用于疔肿、咽炎、扁桃腺炎、腮腺炎等的治疗。方中的黄芪、蒲公英、苦地丁、板蓝根均具有一定的抑菌性,因此在进行微生物限度检查时,必须根据《中华人民共和国药典》(以下简称《中国药典》)规定的方法消除供试液抑菌活性后再进行检查。

本研究通过对 14 个生产企业 14 批次的蒲地蓝消炎片进行方法学验证,确定其微生物限度检查方法,采用该方法对 14 个生产企业 59 批次的蒲地蓝消炎片进行微生物限度检查,并对检验结果进行分析讨论,为该产品的微生物限度标准合理化和产品质量提高提供参考依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Nu-425-400S 型生物安全柜(美国 Nuaire 公

司)、KB240 型低温生化培养箱(德国 BINDER)、BPX-272 型电热恒温培养箱(上海博迅实业有限公司医疗设备厂)、SPX-250B-Z 型生化培养箱(上海博迅实业有限公司医疗设备厂)、CX31RBSFA 奥林巴斯显微镜(日本奥林巴斯株式会社)、VITEK 2 Compact 全自动微生物鉴定及药敏分析系统(法国生物梅里埃)、MALDI-TOF-MS 飞行质谱微生物检测仪(法国生物梅里埃)。

1.2 样品

本试验所用样品蒲地蓝消炎片来自 14 个生产企业 59 个批次,见表 1。

1.3 培养基和稀释液

胰酪大豆胨琼脂培养基(TSA,批号:20151215)、胰酪大豆胨肉汤培养基(TSB,批号:20151215)、沙氏葡萄糖琼脂培养基(SDA,批号:20160107)、麦康凯肉汤培养基(MacB,批号:20160314)、麦康凯琼脂培养基(MacA,批号:20160222)、肠道菌增菌液体培养基(EE,批号:20151215)、紫红胆盐葡萄糖琼脂培养基(VRBG,批号:20151217)、RV 沙门菌增菌液体培养基(RV,批号:20151208)、木糖赖氨酸脱氧胆酸盐琼脂培养基(XLD,批号:20151210),上述培养基均通过培养基适用性检查。稀释液为含 5%吐温 80 的 pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液(批号:20180207)。培养基和稀释液均购于青岛海博高科园生物技术有限公司。

表 1 蒲地蓝消炎片生产企业和批次

Tab. 1 The summary of manufacturers and batches of PudilanXiaoyantablets

序号(No.)	生产厂家(Manufacturer)	批次(Batch)
1	云南白药集团股份有限公司(Yunnan Baiyao Group Co., Ltd.)	8
2	锦州本天药业有限公司(Jinzhou Bentian Pharmaceutical Co., Ltd.)	8
3	甘肃岷海制药有限责任公司(Gansu Minhai Pharmaceutical Co., Ltd.)	8
4	武汉双龙药业有限公司(Wuhan Shuanglong Pharmaceutical Co., Ltd.)	5
5	湖南方盛制药股份有限公司(Hunan Fangsheng Pharmaceutical Co., Ltd.)	4
6	山东孔府制药有限公司(Shandong Kongfu Pharmaceutical Co., Ltd.)	3
7	哈尔滨市龙生北药生物工程股份有限公司(HaerbinLongshengbeiyaoBiopharmaceutical Co., Ltd.)	8
8	安徽济人药业有限公司(Anhui Jiren Pharmaceutical Co., Ltd.)	4
9	佛山益宝生物制药有限公司(Foshan YibaoshengBiopharmaceutical Co., Ltd.)	2
10	云南龙发制药股份有限公司(Yunnan Longfa Pharmaceutical Co., Ltd.)	2
11	广东心宝药业科技有限公司(Guangdong Xinbao Pharmaceutical Technology Co., Ltd.)	2
12	山东仙河药业有限公司(Shandong Xianhe Pharmaceutical Co., Ltd.)	2
13	吉林道君药业股份有限公司(Jilin Daojun Pharmaceutical Co., Ltd.)	2
14	天津中新药业集团股份有限公司隆顺榕制药厂(Tianjin Zhongxin Pharmaceutical Co., Ltd. Longshunrong Pharmaceutical Factory)	1

1.4 菌种

金黄色葡萄球菌[*Staphylococcus aureus*, CMCC (B)26003]、枯草芽孢杆菌[*Bacillus subtilis*, CMCC (B)63501]、大肠埃希菌[*Escherichia coli*, CMCC (B)44102]、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]、黑曲霉[*Aspergillus niger*, CMCC (F)98003]均由中国食品药品检验检定研究院提供。

2 方法与结果

2.1 菌液的制备

按照《中国药典》2015年版四部附录要求制备^[4]。

2.2 供试液的制备

2.2.1 需氧菌总数、霉菌和酵母菌总数计数验证及大肠埃希菌检查的供试液取供试品 10 g,加稀释液至 100 mL,匀浆,制成 1:10 的供试液 A。采用 10 倍系列稀释制成 1:100 供试液 A。

2.2.2 耐胆盐革兰阴性菌检查 供试液取供试品 10 g,加 TSB 至 100 mL,匀浆,制成 1:10 供试液 B,混匀,在 23 ℃ 预培养约 2 h,使供试品中的细菌充分恢复但不增殖。采用 10 倍系列稀释制成 1:100、1:1 000 供试液 B。

2.2.3 沙门菌检查 供试液取供试品 10 g,加 TSB 至 200 mL,匀浆,制成 1:20 供试液 C。

2.3 需氧菌总数、霉菌和酵母菌总数计数方法适用性试验

取“2.1”项下制备的菌液 0.1 mL (菌落数为 1000 ~ 10 000 cfu · mL⁻¹) 加入到稀释液 (不含中和剂吐温 80) 9.9 mL 中,按规定量和方法注入平皿和规定培养基,测定菌数为 a;取“2.2.1”项下制备的供试液按上述方法测定菌数为 b;取“2.1”项下制备的菌液 0.1 mL 加入到“2.2.1”项下制备的 1:10、1:100 供试液 9.9 mL,按上述方法测定菌数为 c;取“2.1”项下制备的菌液 0.1 mL 加入到稀释液 (含 5% 中和剂吐温 80) 9.9 mL 中,按上述方法测定菌数为 d。计数结果按规定时间和温度进行培养后分别按如下公式进行计算:验证组回收率(%): $R1 = (c - b) / a \times 100\%$;中和剂对照组回收率(%): $R2 = d / a \times 100\%$ 。若 $0.5 \leq R1, R2 \leq 2$,可认为该稀释液制备方法和计数方法可用于该样品的菌落计数。蒲地蓝消炎片常规注皿法试验结果见表 2,结果显示蒲地蓝消炎片对 5 株菌均有不同程度的抑制作用。其中,对金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌及枯草芽孢杆菌抑制作用普遍较强,对白色念珠菌也有不同程度的抑制作用,对于黑曲霉的抑制作用相对较弱。基于蒲地蓝消炎片的抑菌作用,本文采用 1:100 供试液进行需氧菌总数计数,采用 1:10 供试液按培养基稀释法 (2 倍稀释法即供试液 0.5 mL/皿,每个平皿加入约 20 mL 培养基) 进行霉菌和酵母菌总数计数。试验结果见表 3 及表 4。结果显示上述方法 5 株菌的回收率均在 0.5 ~ 2.0 的范围内。

表 2 蒲地蓝消炎片微生物限度检查各验证菌的回收率 (常规注皿法)

Tab. 2 The recovery of validation strains in microbial limit test for Pudilan Xiaoyan Tablets (routine pour-plate method)

序号 (No.)	金黄色葡萄球菌 (<i>Staphylococcus aureus</i>)	铜绿假单胞菌 (<i>Pseudomonas aeruginosa</i>)	枯草芽孢杆菌 (<i>Bacillus subtilis</i>)	黑曲霉 * (<i>Aspergillus niger</i>)	白色念珠菌 * (<i>Candida albicans</i>)
1	0.01	0.02	0.03	0.74/0.85	0.22/0.19
2	0.42	0.31	0.59	0.83/1.13	0.78/0.90
3	0.52	0.56	0.22	0.83/0.89	0.69/0.67
4	0.47	0.69	0.48	0.67/1.11	0.80/0.84
5	0.14	0.09	0.04	0.76/0.85	0.43/0.51
6	0.15	0.23	0.13	0.93/0.96	0.60/0.67
7	0.04	0.07	0.00	0.48/0.50	0.45/0.51
8	0.49	0.67	0.46	0.67/0.78	0.74/0.79
9	0.27	0.36	0.29	0.70/0.46	0.57/0.59
10	0.16	0.36	0.32	0.52/0.63	0.26/0.21
11	0.34	0.22	0.26	0.96/0.72	0.67/0.74
12	0.33	0.23	0.29	0.67/0.63	0.71/0.70
13	0.53	0.45	0.58	0.93/1.09	0.70/0.72
14	0.13	0.23	0.13	0.85/1.00	0.51/0.53

注: * 表示所得数据为 TSA 培养基/SDA 培养基上的回收率

Note: * indicates the data as the recovery of microorganisms in TSA and SDA media respectively

表3 蒲地蓝消炎片微生物限度检查各验证菌的回收率(培养基稀释法)

Tab. 3 The recovery of validation strains in microbial limit test for PudilanXiaoyanTablets (medium dilution method)

序号 (No.)	金黄色葡萄球菌 (<i>Staphylococcus aureus</i>)	铜绿假单胞菌 (<i>Pseudomonas aeruginosa</i>)	枯草芽孢杆菌 (<i>Bacillus subtilis</i>)	黑曲霉* (<i>Aspergillus niger</i>)	白色念珠菌* (<i>Candida albicans</i>)
1	1.09	0.85	1.14	0.72/1.00	0.90/0.92
2	0.92	0.90	0.96	0.83/1.13	0.99/0.98
3	1.04	0.85	0.86	0.96/0.85	0.79/0.81
4	0.87	0.83	0.84	1.04/1.11	0.97/0.90
5	0.73	0.90	1.03	0.63/1.04	1.14/1.05
6	0.75	0.91	1.14	0.80/1.07	0.90/1.07
7	0.67	1.05	1.00	0.78/0.72	1.00/1.06
8	0.91	0.78	0.74	0.89/0.80	0.97/1.03
9	0.97	0.90	0.94	0.96/0.91	1.15/1.15
10	0.87	1.00	1.03	1.04/0.80	0.93/0.93
11	0.78	0.95	0.90	1.11/0.87	0.97/0.92
12	0.82	1.02	0.91	1.20/1.17	0.86/0.90
13	0.92	0.69	1.12	0.85/1.33	0.80/0.80
14	1.00	0.90	0.99	0.85/1.22	1.02/1.05

注: * 表示所得数据为 TSA 培养基/SDA 培养基上的回收率

Note: * indicates the data as the recovery of microorganisms in TSA and SDA media respectively

表4 蒲地蓝消炎片微生物限度检查稀释液对照组的回收率

Tab. 4 The recovery of the diluent control group in microbial limit test for PudilanXiaoyan tablets

序号 (No.)	金黄色葡萄球菌 (<i>Staphylococcus aureus</i>)	铜绿假单胞菌 (<i>Pseudomonas aeruginosa</i>)	枯草芽孢杆菌 (<i>Bacillus subtilis</i>)	黑曲霉* (<i>Aspergillus niger</i>) *	白色念珠* (<i>Candida albicans</i>) *
1	1.08	0.97	1.00	0.93/1.22	1.01/1.03
2	0.95	1.01	1.10	1.04/0.91	0.87/0.86
3	1.13	0.97	1.00	0.98/1.07	0.91/0.93
4	1.00	0.94	0.99	0.83/0.89	1.08/1.01
5	1.04	1.01	1.17	1.07/1.26	1.02/0.93
6	1.04	0.91	1.00	0.80/1.07	1.01/0.95
7	0.99	0.93	1.00	1.00/0.93	1.12/0.94
8	1.04	1.01	1.03	1.11/1.02	1.08/1.05
9	1.05	1.01	0.94	1.17/1.13	1.03/1.03
10	0.89	0.89	1.17	1.02/1.02	1.05/0.92
11	0.91	0.95	1.04	0.89/1.09	1.08/0.93
12	1.08	0.91	1.06	0.98/1.17	0.98/1.01
13	1.05	0.92	0.97	1.07/1.11	1.03/0.92
14	1.13	1.01	1.13	1.28/1.00	1.12/0.93

注: * 表示所得数据为 TSA 培养基/SDA 培养基上的回收率

Note: * indicates the data as the recovery of microorganism in TSA and SDA media respectively

2.4 大肠埃希菌检查方法适用性试验

2.4.1 试验组 取 1:10 供试液 10 mL, 接种至 100 mL 的 TSB 培养基中, 加入菌落数不大于 100 cfu 的大肠埃希菌菌悬液。

2.4.2 阴性对照组 取稀释液 10 mL, 接种至

100 mL 的 TSB 培养基中。

2.4.3 阳性对照组 取稀释液 10 mL, 接种至 100 mL 的 TSB 培养基中, 加入菌落数不大于 100 cfu 的大肠埃希菌菌悬液。上述三组培养物于 32.5 °C 培养 24 h, 取培养物 1 mL, 接种至含 100 mL MacB

培养基中,于 42.5 °C 培养 48 h。然后将培养物划线于 MacA 平板上,于 32.5 °C 培养 24 h。试验结果见表 5。14 批验证样品中,供试品对照组及阳性对照组中大肠埃希菌均生长良好,阴性对照组均未见菌生长,该方法适用于大肠埃希菌的检查。

表 5 大肠埃希菌检查方法适用性试验结果

Tab. 5 The suitability test results of *Escherichia coli* test

Groups	TSB	MacB	MacA
试验组 (test group)	+	+	+
阳性对照组 (positive control group)	+	+	+
阴性对照组 (negative control group)	-	-	-

注:“+”表示增菌液浑浊,平板有典型菌落生长;“-”表示增菌液澄清,平板无典型菌落生长

Note: “+” indicates that the enrichment liquid is turbid, and the plate has typical colony growth; “-” indicates that the enrichment liquid is clarified, and the plate has no typical colony growth

2.5 耐胆盐革兰阴性菌检查方法适用性试验

2.5.1 供试品组 取供试液 B 1 mL(1:10、1:100、

1:1 000),接种至 10 mL 肠道菌增菌液体培养基中,分别加入菌落数不大于 100 cfu 的大肠埃希菌悬液和铜绿假单胞菌悬液。

2.5.2 阴性对照组 取 TSB 培养基 1 mL,接种至 10 mL 肠道菌增菌液体培养基。

2.5.3 阳性对照组 取 TSB 培养基 1 mL(1:10、1:100、1:1 000)各两份,接种至 10 mL 肠道菌增菌液体培养基中,分别加入菌落数不大于 100 cfu 的大肠埃希菌悬液和铜绿假单胞菌悬液。

上述培养物于 32.5 °C 培养 24 h。然后将培养物划线于 VRBG 平板上,于 32.5 °C 培养 24 h。试验结果见表 6,14 批验证样品中,供试品对照组大肠埃希菌在含 0.1 g、0.01 g、0.001 g 供试品的试验管中均能够生长;有 3 批供试品对照组铜绿假单胞菌在含 0.1 g 供试品的试验管中不生长,在含 0.01 g、0.001 g 供试品的试验管中均能够生长;阳性对照组大肠埃希菌、铜绿假单胞菌生长良好,阴性对照组均未检出大肠埃希菌和铜绿假单胞菌,该方法适用于耐胆盐革兰阴性菌的检查。

表 6 耐胆盐革兰阴性菌检查方法适用性试验结果

Tab. 6 The suitability test results of bile salt resistant gram-negative bacteria test

组 (groups)	剂量 (dose)/g	大肠埃希菌 (<i>Escherichia coli</i>)		铜绿假单胞菌 (<i>Pseudomonas aeruginosa</i>)	
		EE	VRBG	EE	VRBG
试验组 (test group)	0.1	+	+	- / + (3/11) *	- / + (3/11) *
	0.01	+	+	+	+
	0.001	+	+	+	+
阳性对照组 (positive control group)		+	+	+	+
阴性对照组 (negative control group)		-	-	-	-

注:“+”表示增菌液浑浊,平板有典型菌落生长;“-”表示增菌液澄清,平板无典型菌落生长;“*”表示增菌液澄清,平板上无典型菌落的批次/增菌液浑浊,平板上有典型菌落的批次

Note: “+” indicates that the enrichment liquid is turbid, and the plate has typical colony growth; “-” indicates that the enrichment liquid is clarified, and the plate has no typical colony growth. “*” indicates the batches of “-” and “+” separately

2.6 沙门菌检查验证试验

2.6.1 供试品组 取 1:20 供试液 C 200 mL,加入菌落数不大于 100 cfu 的沙门菌悬液。

2.6.2 阴性对照组 取 TSB 培养基 200 mL。

2.6.3 阳性对照组 取 TSB 培养基 200 mL,加入菌落数不大于 100 cfu 的沙门菌悬液。

上述培养物于 32.5 °C 培养 24 h 后取培养物 0.1 mL 接种至 10 mL RV 沙门菌增菌液体培养基中,32.5 °C 培养 24 h。取少量 RV 沙门菌增菌液体培养物划线接种于 XLD 平板上,32.5 °C 培养 24 h。试验结果见表 7,14 批验证样品中,供试品对照组及阳

性对照组中乙型副伤寒沙门氏菌均生长良好,阴性对照组均未见菌生长,该方法适用于沙门菌的检查。

2.7 样品污染菌的分离与鉴定

分离并纯化从 VRBG、MacA 和 XLD 平板上生长的控制菌株。先通过 VITEK MS 基质辅助激光解析电离飞行时间质谱系统 (MALDI-TOF MS) 对污染菌作快速鉴定,再用 VITEK 全自动微生物鉴定及药敏分析系统作进一步确认。

2.7.1 样品的处理 向 1.5 mL 离心管中加入 300 μL 去离子水,挑取 5~10 mg 菌落样本至离心管中并充分混匀,向上述离心管中加入 900 μL 乙醇并

充分混匀, $12\,000\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 2 min, 吸弃上清, 在室温下干燥沉淀 2~3 min; 再向离心管中加入 70% 甲酸水溶液 50 μL , 再加入等体积的乙腈混合均匀, $12\,000\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 2 min, 以便所有裂解物都能形成沉淀; 吸取 1 μL 上清, 滴加到 MALDI 靶板上, 并在室温下晾干。1 h 内使用 1 μL α -氰基-4-羟基肉桂酸 (α -cyano-4-hydroxycinnamic acid, α -CHCA) 基质溶液覆盖上述样品点, 并在室温下晾干, 随后将 MALDI 靶板放入基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱仪中进行检测。经电离解析飞行时间质谱得出菌株图谱, 与数据库里标准菌株质谱图进行比对分析, 得出鉴定结果。

表 7 沙门菌检查方法适用性试验结果

Tab. 7 The suitability test results of *Salmonella paratyphi*B test

Groups	TSB	RV	XLD
试验组 (test group)	+	+	+
阳性对照组 (positive control group)	+	+	+
阴性对照组 (negative control group)	-	-	-

注: “+”表示增菌液浑浊, 平板有典型菌落生长; “-”表示增菌液澄清, 平板无典型菌落生长

Note: “+” indicates that the enrichment liquid is turbid, and the plate has typical colony; growth; “-” indicates that the enrichment liquid is clarified, and the plate has no typical colony growth

2.7.2 图谱比对分析 飞行时间质谱得出菌株指纹图谱, 与数据库里标准菌株的质谱图相比, 分值愈高, 可信度愈高, 说明待测菌株谱图同质谱库中某一标准菌株的谱图愈相近。采用 MALDI-TOF MS 及全自动细菌鉴定试验系统对蒲地蓝消炎片中检出的污染菌进行菌株鉴定。检出阴沟肠杆菌 (*Enterobacter cloacae*)、恶臭假单胞菌 (*Pseudomonas putida*)、短小芽孢杆菌 (*Bacillus pumilus*)、腐生葡萄球菌 (*Staphylococcus saprophyticus*)、成团泛菌 (*Pantoea agglomerans*) 等共计 5 种污染菌。上述污染菌多为环境常见菌, 没有危害性较大的致病菌, 其中阴沟肠杆菌的检出率最高, 占 83%。

2.8 微生物限度检查结果

蒲地蓝消炎片的微生物限度标准: 需氧菌总数不得过 $10^4\text{ cfu} \cdot \text{g}^{-1}$; 霉菌和酵母菌总数不得过 $10^2\text{ cfu} \cdot \text{g}^{-1}$; 不得检出大肠埃希菌 (1g); 耐胆盐革兰阴性菌应小于 10^2 cfu (1 g); 不得检出沙门菌 (10 g)。

59 批次蒲地蓝消炎片微生物限度检验结果见图 1; 霉菌和酵母菌总数, 56 批次样品为 $<10\text{ cfu} \cdot \text{g}^{-1}$, 占总批数的 95%, 3 批次样品为 $\geq 10\text{ cfu} \cdot \text{g}^{-1}$,

其中最高菌落数为 $15\text{ cfu} \cdot \text{g}^{-1}$, 远 $<200\text{ cfu} \cdot \text{g}^{-1}$ 的最大可接受标准。大肠埃希菌检查均为 1 g 中未检出。耐胆盐革兰阴性菌均为小于 $100\text{ cfu} \cdot \text{g}^{-1}$ 。沙门菌检查均为 10g 中未检出。对 59 批次样品中的需氧菌总数结果进行了统计, 结果见图 1, $X < 100\text{ cfu} \cdot \text{g}^{-1}$ 、 $100 \leq X < 500\text{ cfu} \cdot \text{g}^{-1}$ 、 $500 \leq X < 1\,000\text{ cfu} \cdot \text{g}^{-1}$ 、 $1\,000 \leq X < 10\,000\text{ cfu} \cdot \text{g}^{-1}$ 的检品分别占总批数的 64%、31%、3% 和 2%。其中最高需氧菌总数为 $9\,200\text{ cfu} \cdot \text{g}^{-1}$, 需氧菌总数 $<1\,000\text{ cfu} \cdot \text{g}^{-1}$ 的检品数占总批次的 98%。

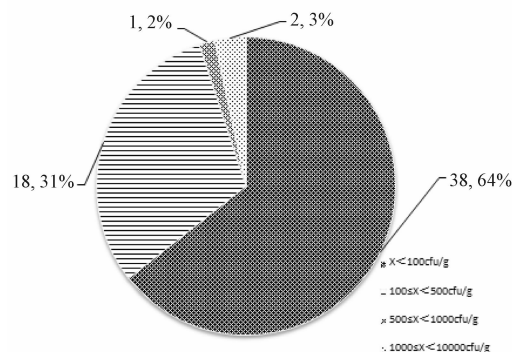


图 1 蒲地蓝消炎片需氧菌总数统计饼状图

Fig. 1 The pie chart of statistical results for total aerobic microbial count of PudilanXiaoyan Tablets

3 讨论

3.1 蒲地蓝消炎片微生物限度验证中抑菌成分的分析

蒲地蓝消炎片中蒲公英、苦地丁、板蓝根、黄芩等均有较强的抑菌性。其中, 蒲公英的绿原酸、总黄酮、多糖分别对大肠杆菌、沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、痢疾杆菌、枯草芽孢杆菌、黑曲霉等有较强的抑制作用^[5]; 苦地丁对金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、生孢梭菌、铜绿假单胞菌、大肠杆菌、白色念珠菌和黑曲霉等均有一定的抑制效果^[6]; 板蓝根能有效抑制金黄色葡萄球菌和大肠埃希菌, 具有广谱抗菌作用, 其水提液对伤寒沙门氏菌、乙型副伤寒沙门氏菌、福氏志贺氏菌、枯草芽孢杆菌等多种菌敏感, 其中枯草芽孢杆菌的抑菌圈边缘清晰, 敏感度较高^[7]; 黄芪提取物对常见的金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、白假丝酵母菌、白地霉、黄曲霉等致病菌具有较明显的体内外抑菌作用^[8]。鉴于蒲地蓝消炎片有较强的抑菌性, 但又不能确定其对微生物限度检查的干扰程度, 前期采用了依次渐进的方法来进行供试

液浓度和检验方法的摸索。

3.2 中和剂吐温 80 对消除供试品抑菌作用的影响

吐温 80 为 O/W 型乳化剂,由山梨醇酐脱水环合并与油酸酯化后再与环氧乙烷加成共聚而成,其对药物抑菌能力的中和作用主要通过药物混合后,将其包裹在内部以降低与菌体的接触来达到。吐温 80 对于季胺类化合物、酚类、苯胺、咪唑、醛类、双胍类均有一定的中和作用,广泛应用于药品、化妆品中防腐剂和抑菌剂的中和^[4-9-10]。

3.3 蒲地蓝消炎片微生物限度检查方法的确定

对于有抑菌成分的样品,常采用稀释法、中和法等手段降低抑菌性,对于抑菌性较强的样品则需要多种手段联合使用^[11]。

需氧菌总数计数采用 1:100 供试液(稀释液采用含 5% 吐温 80 的 pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液),平皿法检查。

霉菌和酵母菌总数计数采用 1:10 供试液(稀释液采用含 5% 吐温 80 的 pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液),培养基稀释法(2 倍稀释)检查。

大肠埃希菌检查采用 1:10 供试液(稀释液采用含 5% 吐温 80 的 pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液)10 mL,接种至 100 mL 的 TSB 培养基中,检查。

耐胆盐革兰阴性菌检查采用 1:10 供试液,检查。

沙门菌检查采用 1:20 供试液,检查。

3.4 蒲地蓝消炎片微生物污染状况分析

药品微生物污染状况是药品质量控制的重要指标。口服中药制剂的中药材来源和生产工艺尤其特殊,微生物学质量分析与评价不仅包括微生物限度检查结果的分析,还应该包括产品中污染菌的分离、鉴定和分析。基质激光解析电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)技术的原理是通过细菌样品与基质(小分子有机酸)溶液形成的共晶体在激光照射下发生电荷转移使分子电离。不同质合比(m/z)的离子在电场作用下加速飞过飞行管道。根据达到飞行时间检测器(TOF)时所用的时间不同而被分离和检测,所测得的蛋白质及多肽质量指纹图谱与标准数据库比对,即可得到鉴定结果。由于所得到的蛋白质图谱中主要的分子离子峰为菌体内高丰度、表达稳定且进化保守的核糖体蛋白,因此其鉴定结果非常稳定可靠。目前,该技术已被应用于多种临床病原菌、食源性致病菌、植物病原菌及环境致病菌的检测^[12]。此次鉴定出的微生物中,阴沟肠杆菌为《卫生部人间传染的病原微生物名录》中的第 3 类

危害程度病原微生物,且为蒲地蓝消炎片样品的主要污染微生物(占总数 68%)。阴沟肠杆菌广泛分布于自然环境中^[13],对人类不是一种主要的致病菌,但被认为是造成医院内感染的主要因素,容易被身体虚弱或免疫力被抑制的人群感染。阴沟肠杆菌还是一种易于形成生物膜的食源性致病菌^[14],形成膜后会增加清除的难度和对药物的耐受性。恶臭假单胞菌、短小芽孢杆菌、腐生葡萄球菌、成团泛菌等均为环境中常见的污染菌。蒲地蓝消炎片样品中的细菌很有可能主要来自中药材原料,因此,有必要对样品中检出的微生物与药材原料的初始污染菌及生产车间中采集的微生物进行同源性比对和溯源分析,确定样品中微生物的来源,为厂家进行样品微生物污染控制提供依据,为药品质量的过程控制提供指导。

4 总结

14 个生产企业 59 批次蒲地蓝消炎片微生物限度检查结果均符合规定,结果满意。污染的微生物主要为药材原料和环境中常见的细菌,不同厂家蒲地蓝消炎片污染的微生物种类较为相似。

参考文献

- [1] YANG YY, DENG JW. Analysis of pharmaceutical products and herbal medicines using ambient mass spectrometry [J]. Trends Anal Chem, 2016, 82:68
- [2] 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
- [3] 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
- [4] 中华人民共和国药典 2015 年版. 四部[S]. 2015:附录 1105 ChP2015. Vol IV[S]. 2015: Appendix 1105
- [5] 李云祥,梁引库,高飞雄,等. 蒲公英脂溶性成分对沙门氏菌抑菌作用机理[J]. 食品工业科技, 2019, 40(4):125
LI YX, LIANG YK, GAO FX, et al. Bacteriostatic Mechanism of liposoluble constituents from Dandelion against Salmonella[J]. SciTechnol Food Ind, 2019, 40(4):125
- [6] 张海全,钟晓坤,黄勤英,等. 响应面法优化苦丁茶熊果酸提取工艺及其抑菌活性研究[J]. 天然产物研究与开发, 2018, 30(11):1978
ZHANG HQ, ZHONG XK, HUANG QY, et al. Optimization of extraction of ursolic acid from Ilex kudingcha C. J. Tseng by Response Surface Method [J]. Nat Product Res Dev, 2018, 30(11):1978
- [7] 阮健,陈彤. 板蓝根类制剂抑菌生物效价测定方法的研究

- [J]. 药物分析杂志, 2016, 36(2): 261
- RUAN J, CHEN T. Determination of biological titers of Radix Isatidis preparations on bacteriostasis [J]. Chin J Pharm Anal, 2016, 36(2): 261
- [8] 郭丽丽, 王小敏, 秦楠, 等. 黄芪茎叶总皂苷提取物的抑菌活性研究[J]. 现代食品科技, 2019, 35(1): 82
- GUO LL, WANG XM, QIN N, *et al.* Study on the antibacterial activity of the total saponins extract from the stems and leaves of *Astragalus Membranaceus* [J]. Mod Food Sci Technol, 2019, 35(1): 82
- [9] European Commission. List of preservatives which cosmetic products may contain preamble [R]. Council directive 1976/768/EEC of July 1976 on the approximation of the laws of the member states relating to cosmetic products (Consolidated Version) 24: EN. 112. 2008
- [10] 化妆品安全技术规范. 微生物检验方法[S]. 2015: 469
- Safety and Technical Standards for Cosmetics. Microbiological test methods[S]. 2015: 469
- [11] 牛振东, 郝运伟, 刘文杰, 等. 地拉罗司分散片微生物限度检查方法研究[J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(1): 36
- NIU ZD, HAO YW, LIU WJ, *et al.* Microbial limit test method of deferasirox dispersible tablets [J]. Chin J Mod Appl Pharm, 2019, 36(1): 36
- [12] 吴婕, 张萍. 基质辅助激光解析-飞行时间质谱分析技术在致病性细菌研究中的应用仪器[J]. 仪表与分析监测, 2010, (2): 1
- WU J, ZHANG P. Study on pathogenic Bacteria by Matrix-assisted Laser Desorption/ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry [J]. Instr Anal Monitoring, 2010, (2): 1
- [13] DANIELHOFFMANN M, SREDNI B, NITZAN Y. Bactericidal activity of the organo-tellurium compound ASI01 against *Enterobacter cloacae* [J]. J Antimicrobial Chemotherapy, 2012, 67(9): 2165
- [14] THOMPSON L J, GRAY V, LINDSAY D. Carbon: nitrogen phosphorus ratios influence biofilm formation by *Enterobacter cloacae* and *Citrobacter freundii* [J]. J Appl Microbiol, 2006, 101(5): 1105

(收稿日期: 2019-04-25)