

图1 颠茄酊 HPLC 图谱

1-山柰酚-3-O-半乳糖-(6→1)鼠李糖-7-O-葡萄糖苷; 2-东莨菪内酯(S); 3-芦丁; 4-6-标定的共有峰。

Fig. 1 HPLC chromatograms of belladonna tinctue

1-kaempferol-3-O-β-D (6-O-α-L-rhamnogalactoside)-7-O-β-D-glucoside; 2-scopoletin(S); 3-rutin; 4-6-marked common peaks.

**2.4.5 样品测定** 参照中国药典 2015 年版特征图谱确定相对保留时间限度为±5%，综合颠茄系列其他品种的测定结果，选择相对峰面积较大且色谱分离良好的 1 号峰和 5 号峰来计算相对峰面积，以达到相对控制多指标含量的目的，峰 1 的相对峰面积≥0.30，峰 5 的相对峰面积≥0.10。共测定 8 批次样品，相对保留时间和相对峰面积均符合规定。

### 3 讨论

#### 3.1 检测波长的选择

取东莨菪内酯对照品溶液适量，置紫外分光光度计进行光谱扫描，结果显示东莨菪内酯在 227 nm 和 344 nm 波长处有最大吸收光谱图，在 344 nm 波长处供试品进样后杂质峰较少，色谱分离也较佳，故确定 344 nm 为测定波长。

#### 3.2 相关性试验

经对颠茄药材、颠茄酊的特征图谱进行相关性比较，结果原料与制剂相关性良好；对 2 家不同药品生产企业生产的颠茄酊产品进行企业间相关性比较，结果企业间产品特征图谱也具有较好的相关性；对我国主要产区山东和湖南产颠茄草进行特征图谱相关性比较，结果不同产区相关性良好。

样品相似度检测结果显示，2 家颠茄酊生产企业提供的 8 批颠茄酊成分特征性明显，成分一致性较好。特征图谱联合东莨菪内酯含量测定，能更好地控制颠茄酊的质量。

### REFERENCES

- [1] 中国药典. 一部[S]. 2015: 420, 421, 1710, 1711.
- [2] 匡海学. 中药化学[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2003: 322.
- [3] HUANG W, GAO J, ZHANG W T, et al. Simultaneous determination of tropane alkaloids in different fractions of *Herba Belladonnae* collected in various seasons by HPLC [J]. *Asian J Chem*, 2013, 25(16): 8967-8970.
- [4] ZHANG N, GUO X H, ZHANG Z Z. Determination of three main components in belladonna tablets by RP-HPLC [J]. *J Med Form(医药论坛杂志)*, 2005, 26(19): 19-20.
- [5] 姜家书, 石国明, 孔泉. HPLC 法测定颠茄流浸膏中硫酸阿托品的含量[J]. *河南中医*, 2008, 30(3): 245-246.
- [6] PANG P, YANG X, SUN W J. HPLC determination of atropine in *Hyoscyamus* extract tablets [J]. *Chin J Pharm Anal(药物分析杂志)*, 2008, 28(3): 414-416.
- [7] LI F, ZUO C X. Content determination of scopolamine hydrobomide and atropine selfate in vitamin U and aluminium capsules [J]. *J Southwest Univ Sci Technol(西南科技大学学报: 自然科学版)*, 2006, 21(1): 119-122.
- [8] WANG Q H, ZHANG X Z, ZHANG C X. Improvement in the content determination on *Extractum Belladonnae Liquidum* [J]. *Drug Stand China(中国药品标准)*, 2006, 7(3): 11-12.
- [9] YANG Z M, WANG Y, ZHANG X J. CE-ECL determination of atropine sulfate in vitamin U and aluminium capsules [J]. *Chin J Pharm Anal(药物分析杂志)*, 2008, 28(7): 1042-1045.
- [10] HUANG W, ZHANG W T, ZHAO W L, et al. Study on identification and content determination of *Extractum Belladonnae Liquidum* [J]. *Chin J Pharm Anal(药物分析杂志)*, 2012, 32(1): 151-154.
- [11] HUANG W, ZHANG W T, ZHAO W L. A quick check of adulterated atropine in belladonna extract tablets [J]. *Chin Med Rep(中国医药导报)*, 2011, 8(32): 67-68.
- [12] 张文婷, 黄伟, 程维明, 等. 颠茄流浸膏和颠茄浸膏非法勾兑快速筛查[J]. *医药导报*, 2013, 32(5): 670-672.

收稿日期: 2016-02-03

## 中国药典 2015 年版八珍胶囊和八珍片微生物限度检查与探讨

陈志禹, 席时东(宁波市药品检验所, 浙江 宁波 315040)

**摘要:** 目的 对八珍胶囊和八珍片微生物限度检查进行方法学验证并对检验结果和污染菌进行分析。方法 八珍胶囊和八珍片采用中国药典 2015 年版微生物限度检查法进行方法验证, 对 6 家 31 批次的八珍胶囊和八珍片进行微生物限度检查, 细菌和酵母菌鉴定采用 VITEK2 全自动微生物鉴定系统。结果 需氧菌总数、真菌和酵母菌总数验证中各菌的回收率均>0.5, 大肠埃希菌检查、耐胆盐革兰阴性菌检查沙门菌检查各验证组均可检出阳性菌。污染的微生物主要是芽孢杆菌。

作者简介: 陈志禹, 男, 硕士, 主管药师 Tel: (0574)87831518 E-mail: jackchenz@163.com

菌等药材原料和环境常见的细菌和酵母菌。**结论** 建立满足中国药典 2015 年版要求的八珍胶囊和八珍片的微生物限度检查方法, 需氧菌总数采用培养基稀释法、真菌和酵母菌总数采用常规法, 大肠埃希菌检查、耐胆盐革兰阴性菌检查和沙门菌检查(针对八珍胶囊)都采用直接接种法。31 批样品的微生物限度检查结果均符合规定, 污染的微生物主要为药材原料和环境常见的芽孢杆菌等。

**关键词:** 八珍胶囊; 八珍片; 中国药典 2015 年版; 微生物限度检查; 耐胆盐革兰阴性菌; 方法验证; 质量分析

**中图分类号:** R916; R693

**文献标志码:** B

**文章编号:** 1007-7693(2016)05-0628-07

**DOI:** 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2016.05.027

## Microbiological Quality Analysis and Evaluation of Chinese Pharmacopoeia (2015 Edition) for Bazhen Capsules and Bazhen Tablets

CHEN Zhiyu, XI Shidong(Ningbo Institute for Drug Control, Ningbo 315040, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To establish the method of microbial limit test for Bazhen capsules and Bazhen tablets, analyze the test results and contaminant microbes. **METHODS** The method validation of Bazhen capsules and Bazhen tablets of microbial limit test of Chinese Pharmacopoeia (2015 Edition) was conducted. Thirty-one batches of Bazhen capsules and Bazhen tablets from 6 manufacturers were tested under the validated method. VITEK 2 Microorganism Identification System was used for bacterial and yeast identification. **RESULTS** The recoveries of 5 validation strains for the total aerobic microbial count, total yeasts and mold count were more than 0.5. In validation of method tests on *Escherichia coli*, bile-tolerant gram-negative bacteria and *Salmonella enterica* subsp., validation strains were detected. The main contaminant microbes were *Bacillus* spp. and microbe related to the herb material and environment. **CONCLUSION** The medium dilution method is used for the total aerobic microbial count, routine pour-plate method is used for total yeasts and molds count. The direct inoculation method is used for the detection of *Escherichia coli*, bile-tolerant gram-negative bacteria and *Salmonella enterica* subsp. (for the capsule). It is satisfactory that the results of microbial limit tests of 31 batches of samples meet test requirements. The main polluted microbes is *Bacillus* spp., which are common in the drug material and production environment.

**KEY WORDS:** Bazhen capsules; Bazhen tablets; Chinese Pharmacopoeia (2015 Edition); microbial limit test; bile-tolerant gram-negative bacteria; validation of method; quality analysis

口服制剂中微生物污染状况的控制是药品质量控制的重要指标<sup>[1-3]</sup>。中国药典 2015 年版的微生物限度检查法结合国情、参考欧美药典<sup>[1]</sup>进行修订, 与 2010 年版的方法在培养基、培养条件和检验方法上都有重大改变。

八珍胶囊和八珍片原方出自明代《正体类要》, 具有补气益血的功效, 用于气血两虚、面色萎黄、食欲不振、月经过多等症, 本品方由党参、白术(炒)、茯苓、甘草、当归、白芍、川芎、熟地黄组成<sup>[4]</sup>。本研究通过对 3 个企业 6 批次八珍胶囊和 3 个企业 4 批次八珍片微生物限度检查法进行验证, 采用经验证的方法对 3 个企业 23 批次八珍胶囊和 3 个企业 8 批次八珍片进行微生物限度检查, 对检验结果和污染的微生物进行分析, 希望为检验机构采用中国药典 2015 年版进行微生物限度检查和微生物质量分析提供参考。

### 1 仪器与材料

#### 1.1 仪器

TC II -1103 电子天平[梅特勒-托利多(常州)称重设备系统有限公司]; TMQ.CV 高压蒸汽灭菌锅

(山东新华医疗器械股份有限公司); M017 生物安全柜(德国 Thermo Fisher Scientific); CP-ST200 电热恒温培养箱(长沙长锦科技有限公司); 222 恒温培养箱(MMM 公司); DM4000B 显微镜(Leica Corporation); VITEK2-Compact(法国生物梅里埃公司)。

#### 1.2 样品

本试验所用 31 批样品, 来自 6 个生产企业, 具体见表 1。

表 1 八珍胶囊和八珍片生产企业和批次

Tab. 1 Manufacturers and batches of Bazhen capsules and tablets

剂型	生产厂家	批次
胶囊	江西杏林白马药业有限公司	18
胶囊	吉林省华威药业有限公司	4
胶囊	通化金马药业集团股份有限公司	1
片剂	潍坊中狮制药有限公司	2
片剂	金花企业(集团)股份有限公司西安金花制药厂	4
片剂	四川志远嘉宝药业有限责任公司	2

#### 1.3 培养基和稀释液

胰酪大豆胨琼脂培养基(TSA, 批号: 0335348)、

胰酪大豆胨肉汤培养基(TSB, 批号: 20130827)、沙氏葡萄糖琼脂培养基(SDA, 批号: 20130830)、麦康凯肉汤培养基(MacB, 批号: 20130625)、麦康凯琼脂培养基(MacA, 批号: 20130912)、肠道菌增菌液体培养基(批号: 20150120)、紫红胆盐葡萄糖琼脂培养基(批号: 20140929)、RV 沙门菌增菌液体培养基(批号: 20150202)、木糖赖氨酸脱氧胆酸盐琼脂培养基(批号: 20150312)均通过适用性检查。稀释液为 pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液(批号: 20130622)。培养基购自碧迪医疗器械(上海)有限公司、北京三药科技开发公司、青岛海博生物技术有限公司或上海中科昆虫生物技术开发有限公司。

#### 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]、白色念珠菌 [*Candida albicans*, CMCC(F)98001]、黑曲霉 [*Aspergillus niger*, CMCC(F)98003]、乙型副伤寒沙门菌 [*Salmonella paratyphi* B, CMCC(B)50094]均由中国食品药品检定研究院提供。

## 2 方法与结果<sup>[2,5]</sup>

### 2.1 菌液的制备

按照中国药典 2015 年版四部要求制备<sup>[2]</sup>。

### 2.2 供试液的制备

**2.2.1 需氧菌总数、真菌和酵母菌总数计数验证及大肠埃希菌检查的供试液的制备** 取样品 10 g, 加 pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液至 100 mL, 匀浆, 制成 1:10 的供试液。采用 10 倍系列稀释制成 1:100 和 1:1000 的供试液。

**2.2.2 耐胆盐革兰阴性菌检查的供试液的制备** 取样品 3 g, 加 TSB 培养基至 30 mL, 匀浆, 制成 1:10 的供试液。

**2.2.3 沙门菌检查的供试液的制备** 取样品 10 g, 加 TSB 培养基至 100 mL, 匀浆, 制备 2 份。

### 2.3 需氧菌总数、真菌和酵母菌总数计数验证试验方法

#### 2.3.1 常规注皿法(每皿 1 mL)

**2.3.1.1 菌液对照组** 取“2.1”项下的菌液 0.1 mL (菌落数为 3 000~10 000 cfu·mL<sup>-1</sup>) 加入到 10 mL

pH 7.0 氯化钠-蛋白胨缓冲液中, 取 1 mL 注入平皿中, 加入培养基, 测定菌液中的菌落数, 结果为 a。

**2.3.1.2 供试品对照组** 取稀释液 0.1 mL 加入到“2.2.1”项下的 10 mL 供试液中, 取 1 mL 注入平皿中, 加入培养基, 测定样品中的菌落数, 结果为 b。

**2.3.1.3 试验组** 取“2.1”项下的菌液 0.1 mL (菌落数为 3 000~10 000 cfu·mL<sup>-1</sup>) 加入到“2.2.1”项下的 10 mL 供试液中, 取 1 mL 注入平皿中, 加入培养基, 测定菌液中的菌落数, 结果为 c。

#### 2.3.2 培养基稀释法(每皿 0.2 mL)

**2.3.2.1 菌液对照组** 取“2.1”项下的菌液 0.1 mL (菌落数为 15 000~50 000 cfu·mL<sup>-1</sup>) 加入到 10 mL pH 7.0 氯化钠-蛋白胨缓冲液中, 取 0.2 mL 注入平皿中, 加入培养基, 测定菌液中的菌落数, 结果为 a。

**2.3.2.2 供试品对照组** 取稀释液 0.1 mL 加入到“2.2.1”项下的 10 mL 供试液中, 取 1 mL, 分别注入 5 个平皿中, 加入培养基, 测定样品中的菌落数, 结果为 b(此处为 0.2 mL 样品中的菌落数)。

**2.3.2.3 试验组** 取“2.1”项下的菌液 0.1 mL (菌落数为 15 000~50 000 cfu·mL<sup>-1</sup>) 加入到“2.2.1”项下的 10 mL 供试液中, 取 0.2 mL 注入平皿中, 加入培养基, 测定菌液中的菌落数, 结果为 c。

TSB 培养基平板在 33 °C 培养 3~5 d, 沙氏葡萄糖琼脂培养基平板在 23 °C 培养 5~7 d。

**2.3.3 计算** 分别按如下公式进行计算 验证组回收率(%):  $R=(c-b)/a \times 100\%$ 。若  $0.5 \leq R \leq 2$ , 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; 若  $R < 0.5$ , 可认为该稀释液制备方法和计数方法不能用于该样品的菌落计数。

**2.3.4 结果** 所有样品的黑曲霉和白色念珠菌的回收率均 >50%; 铜绿假单胞菌和枯草芽孢杆菌的回收率偏低, 很多批次 <50%, 结果见表 2。因此, 采用常规注皿法进行真菌和酵母菌总数计数, 需进一步采用培养基稀释法(每皿 0.5 或 0.2 mL)进行需氧菌总数计数验证。

每皿 0.5 mL 时, 部分批次样品的枯草芽孢杆菌回收率仍 <50%; 当采用每皿 0.2 mL 时, 金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌和枯草芽孢杆菌的回收率都 >50%, 结果见表 3。说明可采用培养基稀释法(每皿 0.2 mL)进行需氧菌总数计数。

表 2 常规注皿法各验证菌的回收率(n=2)

Tab. 2 Recovery of validation strains of routine pour-plate method(n=2) %

金黄色葡萄球菌	铜绿假单胞菌	枯草芽孢杆菌	黑曲霉*	白色念珠菌*
68	71	43	91/85	92/96
59	45	48	98/96	99/101
70	39	39	100/99	96/95
72	85	49	102/92	103/89
55	83	34	92/91	96/87
73	70	48	89/86	98/94
71	39	29	85/94	91/97
66	58	61	99/86	102/96
58	41	46	89/91	98/94
70	78	35	97/103	87/99

注: \*分别为 TSA/SDA 培养基上的回收率。

Note: \*The recovery of TSA/SDA medium.

## 2.4 大肠埃希菌检查验证试验

2.4.1 供试品组 取供试液 10 mL, 接种至 100 mL 的 TSB 培养基中。

2.4.2 阴性对照组 取 pH 7.0 氯化钠-蛋白胨缓冲液 10 mL, 接种至 100 mL 的 TSB 培养基中。

2.4.3 阳性验证组 取供试液 10 mL, 接种至 100 mL 的 TSB 培养基中, 加入菌落数在 10~100 cfu 的大肠埃希菌菌悬液。

表 3 培养基稀释法各验证菌的回收率(n=2)

Tab. 3 Recovery of validation strains of medium dilution method(n=2) %

稀释方法/mL	金黄色葡萄球菌	铜绿假单胞菌	枯草芽孢杆菌
0.5	73	74	89
0.2	81	92	88
0.5	75	78	42
0.2	92	89	78
0.5	80	52	59
0.2	97	88	88
0.5	78	78	79
0.2	94	91	93
0.5	72	79	38
0.2	85	95	71
0.5	97	82	72
0.2	98	94	82
0.5	73	57	36
0.2	82	87	89
0.5	88	64	61
0.2	91	96	97
0.5	69	54	44
0.2	99	90	85
0.5	80	79	50
0.2	93	100	88

上述培养物于 33 °C 培养 18 h, 取培养物 1 mL, 接种至含 100 mL MacB 培养基中, 于 42 °C

培养 24 h。然后将培养物划线于 MacA 平板上, 于 33 °C 培养 18 h。

阳性验证组大肠埃希菌均生长良好, 阴性对照组均未见菌生长, 供试品组均未见菌生长, 可以采用直接接种法进行大肠埃希菌检查。

## 2.5 耐胆盐革兰阴性菌检查验证试验

供试品组供试液 10 mL; 阴性对照组取 TSB 培养基 10 mL; 阳性验证组取供试液 10 mL 2 份, 分别加入菌落数在 10~100 cfu 的大肠埃希菌菌悬液或铜绿假单胞菌菌悬液。上述培养物于 23 °C 培养 2 h, 取培养物 10 mL 接种至 100 mL 肠道菌增菌液体培养基中, 于 33 °C 培养 24 h。然后将培养物划线于紫红胆盐葡萄糖琼脂平板上, 于 33 °C 培养 18 h。

阳性验证组大肠埃希菌和铜绿假单胞菌均生长良好, 阴性对照组均未见菌生长, 供试品组均未见菌生长, 可以采用直接接种法进行耐胆盐革兰阴性菌检查。

## 2.6 沙门菌检查验证试验

供试品组供试液 100 mL; 阴性对照组取 TSB 培养基 100 mL; 阳性验证组取供试液 100 mL, 加入菌落数在 10~100 cfu 的沙门菌菌悬液。上述培养物于 33 °C 培养 18 h。然后取培养物 0.1 mL 接种至 10 mL RV 沙门增菌液体培养基中, 33 °C 培养 18 h。取少量 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, 33 °C 培养 18 h。

阳性验证组沙门菌均生长良好, 阴性对照组均未见菌生长, 供试品组均未见菌生长, 可以采用直接接种法进行沙门菌检查。

## 2.7 污染菌的分离与鉴定

细菌和酵母菌的分离与鉴定流程见图 1。对 69 株细菌和 20 株酵母菌进行菌种鉴定, 结果见表 4, 69 株细菌中, 34 株属于芽孢杆菌属, 占总数的 49%, 6 株属于假单胞菌属。共鉴定出 23 种细菌和 3 种酵母菌, 其中 1 种阳性球菌, 13 种阴性杆菌, 9 种芽孢杆菌。TSA 培养基和营养琼脂培养基上检出的微生物种类具有较高的一致性, 8 种细菌在 2 种培养基中同时被检出。SDA 培养基上鉴定出的细菌和酵母菌种类数都多于玫瑰红钠琼脂培养基。新型隐球菌和蜡样芽孢杆菌/苏云金芽孢杆菌/蕈状芽孢杆菌都被列入《卫生部人间传染的病原微生物名录》第三类危害程度。

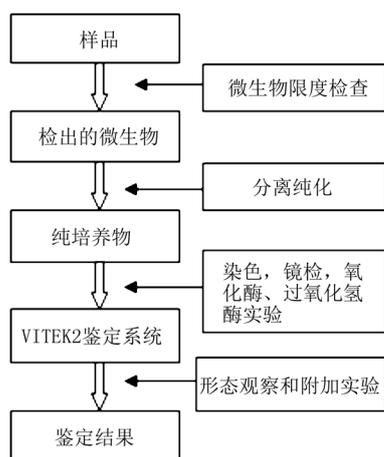


图1 微生物分离与鉴定流程图

Fig. 1 Process of microbe purification and identification

## 2.8 微生物限度检查结果

八珍胶囊的微生物限度标准<sup>[2]</sup>: 需氧菌总数  $10^4$  cfu·g<sup>-1</sup>; 真菌和酵母菌总数  $10^2$  cfu·g<sup>-1</sup>; 不得检出大肠埃希菌(1 g); 不得检出沙门菌(10 g); 耐胆盐革兰阴性菌应  $<10^2$  cfu(1 g)。八珍片的微生物限度标准: 需氧菌总数  $10^3$  cfu·g<sup>-1</sup>; 真菌和酵母菌总数  $10^2$  cfu·g<sup>-1</sup>; 不得检出大肠埃希菌(1 g)。需氧菌总数、真菌和酵母菌总数标准解释如下: 10 cfu, 可接受的最大菌数为 20;  $10^2$  cfu, 可接受的最大菌数为 200; 依此类推。

23 批八珍胶囊微生物限度检查结果: 需氧菌总数  $<10$  cfu·g<sup>-1</sup> 的检品占总批数的 70%, 最高菌落数为 40 cfu·g<sup>-1</sup>, 远  $<20\ 000$  cfu·g<sup>-1</sup> 的最大可接受数; 真菌和酵母菌总数  $<10$  cfu·g<sup>-1</sup> 的检品占总批数的 87%, 3 个批次样品为  $\geq 10$  cfu·g<sup>-1</sup>, 最高菌落数为 25 cfu·g<sup>-1</sup>, 远  $<200$  cfu·g<sup>-1</sup> 的最大可接受数; 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 1 g 中未检出, 沙门菌均为 10 g 中未检出。结果较为满意。

8 批八珍片微生物限度检查结果: 需氧菌总数  $>10$  cfu·g<sup>-1</sup> 的检品占总批数的 50%, 最高菌落数为 380 cfu·g<sup>-1</sup>, 远  $<2\ 000$  cfu·g<sup>-1</sup> 的最大可接受数; 6 批样品的真菌和酵母菌总数  $<10$  cfu·g<sup>-1</sup>, 有 2 批样品的结果分别为 100, 200 cfu·g<sup>-1</sup>, 虽然未  $>200$  cfu·g<sup>-1</sup>, 但真菌和酵母菌污染较为严重; 大肠埃希菌检查均为 1 g 中未检出。

采用中国药典 2015 年版方法, 31 批次样品中需氧菌总数  $\geq 10$  cfu·g<sup>-1</sup> 的为 11 批, 占总数的 35%, 平均菌落数为 19 cfu·g<sup>-1</sup>; 中国药典 2010 年版方

法, 细菌数  $\geq 10$  cfu·g<sup>-1</sup> 的为 6 批, 占总数的 19%, 平均菌落数为 14 cfu·g<sup>-1</sup>。中国药典 2015 年版需氧菌总数的检出率和平均菌落数都高于 2010 年版的细菌数。采用中国药典 2015 年版方法, 31 批次样品中真菌和酵母菌总数  $\geq 10$  cfu·g<sup>-1</sup> 的为 5 批, 平均菌落数为 11 cfu·g<sup>-1</sup>; 采用 2010 年版方法, 真菌和酵母菌总数  $\geq 10$  cfu·g<sup>-1</sup> 的为 2 批, 平均菌落数为 8 cfu·g<sup>-1</sup>。中国药典 2015 年版真菌和酵母菌总数的检出率和平均菌落数都高于 2010 年版的。31 批样品均未检出大肠埃希菌, 结果与 2010 年版方法一致, 但是有 2 批八珍胶囊样品的麦康凯琼脂平板上有菌落生长, 经鉴定为阴沟肠杆菌复合菌 (*Enterobacter cloacae* complex, 99%) 和少见嗜铜菌 (*Cupriavidus pauculus*, 95%), 有 3 批八珍片样品的麦康凯琼脂平板上有菌落生长, 经鉴定为泛菌属 (*Pantoea* spp, 93%) 和沃氏葡萄球菌 (*Staphylococcus warneri*, 94%)。

## 3 讨论

中国药典 2005 年版<sup>[6]</sup>微生物限度检查开始引入方法验证试验。中国药典 2015 年版由于培养体系的变化, 微生物限度检查方法将需要再次验证。本研究结果表明, 中国药典 2015 年版微生物限度检查可以参照 2010 年版验证过的方法<sup>[7]</sup>, 采用类似的稀释步骤, 建立满足中国药典 2015 年版要求的微生物限度检查方法。

TSA 培养基上需氧菌总数的检出率和平均菌落数明显高于营养琼脂培养基上的细菌数, 说明 TSA 更适合样品中微生物的复苏, 有较高的检测灵敏度<sup>[8]</sup>。SDA 培养基上真菌和酵母菌总数的检出率和平均菌落数都明显高于玫瑰红钠琼脂培养基, 当计数结果超出最大可接受数范围时, 需要通过向培养集中添加抗生素来抑制细菌的生长。

大肠埃希菌的检查方法, 中国药典 2010 年版直接用选择性的 BL 培养基进行增菌培养, 然后又选用特异性生化培养基 MUG 进行鉴定, 对生长微弱微生物的复壮会有影响。中国药典 2015 年版的方法增加了受伤菌株的复壮培养, 更有利于样品中处于休眠或者半休眠状态的大肠埃希菌的检出, 可以增加样品目标菌的检出率, 防止漏检。耐胆盐革兰阴性菌是指在胆汁中可以存活并繁殖的革兰阴性菌, 包括了肠杆菌科、弧菌科、非发酵菌和革兰阴性小杆菌, 大肠菌群只占其中很小

表 4 细菌和酵母菌鉴定结果

Tab. 4 Bacterial and yeast identification results

序号	培养基来源	革兰氏染色	鉴定卡片	VITEK2 鉴定结果
1	T	阳性球菌	GP	变异考克菌( <i>Kocuria varians</i> )(97%)
2	T, Y, S	阴性杆菌	GN	泛菌属( <i>Pantoea</i> spp)(95%)
3	T, Y, H	阴性杆菌	GN	栖稻假单胞菌( <i>Pseudomonas oryzihabitans</i> )(87%)
4	T, Y	阴性杆菌	GN	少动鞘氨醇单胞菌( <i>Sphingomonas paucimobilis</i> )(98%)
5	T, Y	阴性杆菌	GN	肺炎克雷伯菌臭鼻亚种( <i>Klebsiella pneumoniae ssp ozaenae</i> )(96%)
6	T	阴性杆菌	GN	温和气单胞菌( <i>Aeromonas sobria</i> )(86%)
7	Y	阴性杆菌	GN	放射根瘤菌( <i>Rhizobium radiobacter</i> )(99%)
8	Y	阴性杆菌	GN	荧光假单胞菌( <i>Pseudomonas fluorescens</i> )(96%)
9	Y	阴性杆菌	GN	犬巴斯德菌( <i>Pasteurella canis</i> )(90%)
10	S	阴性杆菌	GN	杀鲑气单胞菌( <i>Aeromonas salmonicida</i> )(90%)
11	S	阴性杆菌	GN	伤口埃希菌( <i>Escherichia vulneris</i> )(93%)
12	S	阴性杆菌	GN	吉氏玫瑰单胞菌( <i>Roseomonas gilardii</i> )(99%)
13	S, H	阴性杆菌	GN	浅黄假单胞菌( <i>Pseudomonas luteola</i> )(97%)
14	H	阴性杆菌	GN	鲍曼不动杆菌复合菌( <i>Acinetobacter baumannii</i> complex)(85%)
15	T, Y, S, H	阳性芽孢杆菌	BCL	巨大芽孢杆菌( <i>Bacillus megaterium</i> )(97%)
16	T, Y	阳性芽孢杆菌	BCL	枯草芽孢杆菌/解淀粉芽孢杆菌/深褐芽孢杆菌( <i>Bacillus subtilis/amyloliquefaciens/atropheus</i> )(98%)
17	T, Y	阳性芽孢杆菌	BCL	地衣芽孢杆菌( <i>Bacillus licheniformis</i> )(96%)
18	T, Y	阳性芽孢杆菌	BCL	环状芽孢杆菌( <i>Bacillus circulans</i> )(93%)
19	T	阳性芽孢杆菌	BCL	缓慢芽孢杆菌( <i>Bacillus lentus</i> )(92%)
20	T	阳性芽孢杆菌	BCL	孢子短芽孢杆菌( <i>Brevibacillus choshinensis</i> )(89%)
21	T	阳性芽孢杆菌	BCL	死谷芽孢杆菌( <i>Bacillus vallismortis</i> )(96%)
22	Y	阳性芽孢杆菌	BCL	蜡样芽孢杆菌/苏云金芽孢杆菌/蕈状芽孢杆菌( <i>Bacillus cereus/thuringiensis/mycooides</i> )(89%)
23	Y	阳性芽孢杆菌	BCL	解淀粉类芽孢杆菌( <i>Paenibacillus amylolyticus</i> )(90%)
24	T, S, H	阳性	YST	粘红酵母/胶红酵母( <i>Rhodotorula glutinis/mucilaginoso/(Crypto.laurentii)</i> )(91%)
25	S, H	阳性	YST	浅白隐球菌( <i>Cryptococcus albidus</i> )(97%)
26	S	阳性	YST	新型隐球菌( <i>Cryptococcus neoformans</i> )(92%)

注: T 为 TSA 培养基, Y 为营养琼脂培养基, S 为 SDA 培养基, H 为玫瑰红钠琼脂培养基。

Note: T is Soybean-Casein agar, Y is Nutrient agar, S is Sabouraud Dextrose agar, H is Rose Bengal Agar mediu.

的一部分。在乳糖胆盐发酵培养的过程中,含药材原粉的中成药会影响实验者对产气的判断;部分大肠菌群迟缓发酵乳糖,有的产酸未产气<sup>[9]</sup>。中国药典 2015 年版方法增加了受伤菌株的复壮培养,可以增加目标菌的检出率,且不受样品颜色和粉末的干扰。中国药典 2015 年版规定含药材原粉的口服中药制剂不得检出沙门菌(10 g),这对中药制剂的微生物质量控制提出了更高的要求。

药品微生物污染状况是药品质量控制的重要指标<sup>[10]</sup>。口服中药制剂的中药材来源和生产工艺有其特殊性,微生物学质量分析与评价不仅应包括药品的微生物限度检查结果分析,还应当包括产品污染菌的分离、鉴定和分析。此次鉴定出的微生物中,被列入《卫生部人间传染的病原微生物

名录》第三类危害程度的有 2 种,应该引起重视。八珍胶囊和八珍片主要污染的微生物是芽孢杆菌属和假单胞菌属,这 2 类细菌主要存在于土壤和根际<sup>[11]</sup>,污染的细菌很有可能主要来自其生产所用的原料——中药材。31 批次样品中,来自 2 个厂家的 2 批次八珍片的真菌和酵母菌数较高,酵母菌经鉴定主要为粘红酵母/胶红酵母和浅白隐球菌 2 种,另有一株为新型隐球菌。红酵母属是一类腐生菌,植物体、水和空气中常有<sup>[12]</sup>,隐球菌主要分布在动物和植物上<sup>[13]</sup>。2 批次样品中的酵母菌污染可能来自中药材、生产用水或者生产过程中,需要对药品生产全过程做进一步的分析。

#### 4 总结

需氧菌总数采用培养基稀释法、真菌和酵母

菌总数采用常规法, 大肠埃希菌检查、耐胆盐革兰阴性菌检查和沙门菌检查(针对八珍胶囊)都采用直接接种法。3 个企业 23 批次八珍胶囊和 3 个企业 8 批次八珍片样品微生物限度检查结果均符合规定, 结果较为满意。污染的微生物主要为药材原料和环境中常见的细菌和酵母菌, 不同厂家的八珍胶囊和八珍片样品污染的微生物种类较为相似。

## REFERENCES

- [1] USP35-NF30 [S]. 2012: Appendix 61.
- [2] 中国药典. 四部[S]. 2015: 附录 1105-1107.
- [3] 中国药典. 一部[S]. 2010: 附录 VIII C.
- [4] MEI Q X. The new usage of Bazhen pills (granules) [J]. Family Tradit China Med(家庭中医药), 2003, 10(2): 53-54.
- [5] SU D M, MA X R, XU H Y, et al. Examine Technique of Pharmaceutical Microbiology [M]. Beijing: Hualing Publishing House, 2007.
- [6] 中国药典. 一部[S]. 2005: 附录 VIII C.
- [7] CHEN Z Y, XIA J, XI S D. Establishment of microbial limit

- test for Bazhen preparations and the analysis of the test results [J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2016, 36(4): 758-766.
- [8] YOU Y N, CHEN X Q, ZHOU Z Y, et al. Comparison the colony counting method between the 2005 version Chinese Pharmacopoeia and the mainly overseas pharmacopoeia [J]. Chin Pharm Aff(中国药事), 2010, 24(6): 587-589.
- [9] 朱文娟. 大肠菌群检查与胆汁耐受革兰阴性菌检查比较研究[J]. 中国医药指南, 2012, 10(34): 109-111.
- [10] ZHENG X L, WANG Z N, WANG Z J, et al. Establishment of the environmentally microbial library in the drug sterility testing laboratory [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2015, 32(7): 847-850.
- [11] KANG Y J, SHEN M, WANG H L, et al. Diversity, microbial ecology and isolated methods of plant growth-promoting Rhizobacteria (PGPR) [J]. Hubei Agricult Sci(湖北农业科学), 2012, 51(24): 5553-5558.
- [12] SOTIRIOS T, SOTIRIOS P, JOSEPH M, et al. Rhodotorula mucilaginosa associated meningitis: a subacute entity with high mortality. Case report and review [J]. Med Mycol Case Report, 2014(6): 46-50.
- [13] DINIZ P L J, JANAINA V R S A, EVELIN R M, et al. *Cryptococcus* spp isolated from dust microhabitat in Brazilian libraries[J]. J Occup Med Toxicol, 2012, 7(1): 11-17.

收稿日期: 2015-07-07

## 瑞他莫林软膏的微生物限度检查适用性试验

郑小玲, 王征南, 李珏(浙江省食品药品检验研究院, 杭州 310052)

**摘要:** 目的 建立瑞他莫林软膏的微生物限度检查方法, 并进行适用性实验。方法 用十四烷酸异丙酯溶解后, 按照中国药典 2015 年版第四部通则 1105 和 1106 对瑞他莫林软膏进行微生物限度检查适用性实验。需氧菌总数计数、真菌和酵母菌总数计数采用降低取样量后薄膜过滤, 并在水相冲洗液中加入乳化剂聚山梨酯 80, 控制菌检查采用培养基稀释法。结果 需氧菌总数计数、真菌和酵母菌总数计数适用性实验中的回收率比值均在 0.5~2 内; 控制菌检查适用性实验中未检出金黄色葡萄球菌, 检出铜绿假单胞菌。结论 瑞他莫林软膏具有较强的抑菌性且基质特殊, 按照中国药典 2015 年版规定, 本试验建立的方法可作为瑞他莫林软膏的微生物限度检查方法。

**关键词:** 瑞他莫林; 微生物限度检查; 适用性试验; 薄膜过滤法

中图分类号: R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2016)05-0634-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2016.05.028

## Applicability Test of Microbial Limit Test for Retapamulin Ointment

ZHENG Xiaoling, WANG Zhengnan, LI Jue(Zhejiang Institute for Food and Drug Control, Hangzhou 310052, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To establish and verify a method for the microbial limit test of Retapamulin ointment. **METHODS** The applicability test for Retapamulin ointment was conducted according to the microbial limit test in the general rules 1105 and 1106 of Chinese Pharmacopoeia (2015 Edition) Vol V. Retapamulin ointment was dissolved with isopropyl myristate, and then filtrated by membran. After filtration, total count of aerobic bacteria, total count of molds and yeasts with reducing the amount of sample and adding Tween-80 in aqueous washing solution, the culture medium dilution method was used for control microorganisms test. **RESULTS** The recovery ratios of applicability test of total count of aerobic bacteria and total count of molds were in the range of 0.5~2. *Staphylococcus aureus* was not detected and *Pseudomonas aeruginosa* was detected

作者简介: 郑小玲, 女, 硕士, 主管药师 Tel: (0571)86459427 E-mail: 88920169@qq.com