

国药典 2010 年版和 2015 年版的判定标准,然而④号样品使用的抑菌剂为苯甲酸,使用浓度为 $1.95\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$,有文献报道过量摄入苯甲酸会对肝脏产生极大地威胁,甚至致癌^[7]。过高的抑菌剂浓度或高毒性的抑菌剂成分会对患者尤其是婴幼儿产生潜在危害,违背了制剂中使用抑菌剂的初衷,这也提示我们应进一步探索抑菌剂的最低使用浓度,确保用药安全。

根据使用说明书中用法与用量的规定,每瓶装 100 mL 规格的健儿消食口服液如连续服用则会在 2~10 d 内服用完毕,而药典规定抑菌效力的监测时间点仅为 14, 28 d,实验设计中增加的监测点测定结果表明,抑菌剂在 24, 48 h 并未产生明显作用,即在药品被污染初期,抑菌剂对微生物抑制作用有限,继而可能会对患者产生危害。建议应根据药品用法与用量,适当增加必要的监测点,保证药品在整个使用周期内的安全、有效。

正交实验中观察发现,部分接种了黑曲霉的实验样本从第 5 天开始陆续出现明显的霉变现象,表现性状发生改变的实验样本与表 5 中对真菌抑菌效力不符合规定的实验样本是一致的,说明发生霉变的抑菌剂浓度和 pH 值的两两组合对真菌尤其是黑曲霉的抑制作用较弱。因此,企业在筛选最佳抑菌剂处方时,应结合抑菌剂浓度和 pH 值

等因素进行综合考虑,进而确定制剂中抑菌剂的最低有效量。

山梨酸钾是国际公认的低毒、高效的酸性防腐剂,对细菌、真菌、酵母菌均有一定的抑制作用^[5,9]。然而,抑菌效力实验过程中,山梨酸钾对白色念珠菌和黑曲霉的抑制作用却不明显,可能是由于健儿消食口服液中含有大量的糖类物质,适合真菌的生长。

REFERENCES

- [1] 中华人民共和国卫生部. 卫生部药品标准[S]. 中药成方制剂第五册. 1992: 134.
- [2] 中国药典. 一部[S]. 2015: 1362-1363.
- [3] 中国药典. 四部[S]. 2015: 通则 1121:151-153.
- [4] 中国药典. 一部[S]. 2010: 附录 X VIII D 134-135.
- [5] 王国军. 山梨酸(钾)的性能及其应用[J]. 中国食品, 2011(11): 56-58.
- [6] ZENG T, XIE Y X, MA L. Study on the toxicity of potassium sorbate [J]. Hainan Med J(海南医学), 2012, 23(19): 19-21.
- [7] NAIR B. Final report on the safety assessment of benzyl alcohol, benzoic acid, and sodium benzoate [J]. Int J Toxicol, 2000(20): 23-50.
- [8] ZHOU J Q, MEI D. Influence of pharmaceutical packaging materials on quality and safety of medicines [J]. Adv Drug React J(药物不良反应杂志), 2011, 13(1): 27-31.
- [9] MA Y S, LIANG Y M. Examples of potassium sorbate applied in meat and related products [J]. Meat Indust(肉类工业), 2006(8): 3-4.

收稿日期: 2016-02-29

中药饮片麦冬和芫花中耐热菌的考察

李珏, 郑小玲, 梁法勇, 沈泓(浙江省食品药品检验研究院, 杭州 310052)

摘要: 目的 考察中药饮片麦冬和芫花中耐热菌的种类和数量,并探索在冷藏储存过程中的变化情况。方法 采用中国药典 2015 年版方法测定不同沸水浴时间的耐热菌数,并对 120 min 沸水浴处理后存活耐热菌采用 16S rDNA 基因序列分析方法进行菌种鉴定,同时考察了冷藏储存一定时间后耐热菌数的变化。结果 随着沸水浴时间的增加,耐热菌数不断减少。芫花即使经过 120 min 沸水浴处理后仍含有较高数量的耐热菌,且经 48 h 冷藏储存后,耐热菌数量出现明显增加。耐热菌株鉴定结果均为芽孢杆菌属。结论 从用药安全性角度考虑,应控制中药饮片中的耐热菌,并关注中药代煎服务存在的微生物污染问题。

关键词: 麦冬; 芫花; 中药饮片; 微生物; 耐热菌

中图分类号: R283.1

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2016)05-0642-03

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2016.05.030

基金项目: 浙江省药品接触材料质量控制研究重点实验室(2014E10006)

作者简介: 李珏,女,硕士,副主任药师 Tel: (0571)86459427 E-mail: lj811005@163.com

Investigation of Thermotolerant Bacteria in Chinese Herbal Medicine: *Ophiopogonis Radix* and *Genkwa Flos*

LI Jue, ZHENG Xiaolin, LIANG Fayong, SHENG Hong(Zhejiang Institute for Food and Drug Control, Hangzhou 310052, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the thermotolerant bacteria species and contamination in *Ophiopogonis Radix* and *Genkwa Flos*, explore the influence on the thermotolerant bacteria by refrigerated storage. **METHODS** According to Chinese Pharmacopoeia (2015 edition), the amounts of the thermotolerant bacteria were identified after different boiling bath time, and the species of thermotolerant bacteria were identified by 16S rDNA gene sequence test system. To investigate the variation of the thermotolerant bacteria by refrigerated storage at the same time. **RESULTS** By increasing the boiling bath time, the amounts of thermotolerant bacteria were reduced. The thermotolerant bacteria were still at high quantity even after 120 min boiling bath in *Genkwa Flos*, and after 48 h refrigerated storage, the amounts of thermotolerant bacteria were significantly increased. The thermotolerant bacteria were *subtilis*. **CONCLUSION** For safety pledge, it is recommended to control thermotolerant bacteria in the Chinese herbal medicine, and pay attention to the microbial contamination of TCM decoction service.

KEY WORDS: *Ophiopogonis Radix*; *Genkwa Flos*; Chinese herbal medicine; microbiological; thermotolerant bacteria

中药饮片是我国中药产业的三大支柱之一，是中医临床辨证施治必需的传统武器，也是中成药的重要原料，饮片质量的好坏直接关系到临床用药安全和有效^[1]。中药饮片大都含有淀粉、糖类、蛋白质等成分，易发生霉烂、虫蛀等微生物污染现象，使得药材中有效成分含量严重下降，药效降低甚至失去药用价值，严重的还会产生不良反应^[2-3]。因此，有效控制中药饮片的微生物污染状况十分必要。中国药典 2015 年版首次对中药饮片的微生物限度提出要求。

中药饮片经过一系列炮制过程以及服用前的煎煮或者冲泡后，微生物数量会有明显下降，但仍有部分无法杀死，即存在一定数量的耐热菌。这些耐热菌在饮片的炮制、煎煮等过程中，往往未被热力作用杀灭，最终进入人体，可能引起食物中毒、肠绞痛等疾病，严重威胁患者的身体健康。目前，各大中医院、中药店和省市级综合性医院中药房等均提供代煎服务，越来越多的患者选择代煎，然而代煎药业务给患者带来便利的同时，也存在一些潜在的隐患。除了煎煮的方式、方法不正确影响药效之外，微生物污染问题也很难有效控制^[4]。

本试验通过对中药饮片麦冬和芫花进行加热煮沸处理，研究中药饮片中耐热菌的数量及种类，并探索目前代煎中药在储存过程中的微生物变化情况。

1 仪器与材料

生物安全柜(美国 Thermo 公司); 生化培养箱(德国 Memmert 公司); 3500 Genetic Analyzer 全自动基因测序系统(美国 LT 公司); 生物显微镜(日本 Nikon

公司)。

麦冬(杭州胡庆余堂国药号，批号：131205)，芫花(嘉兴东元国药饮片有限公司，批号：130512)，由浙江省食品药品检验研究院郭增喜主任中药师鉴定。麦冬和芫花均已被中国药典收录^[5]。胰蛋白胍大豆琼脂培养基(Tryptic soy agar medium, TSA, 美国 BD 公司，批号：8308494)。3500 MicroSeq 系统配套试剂。

2 方法与结果

2.1 不同沸水浴时间对耐热菌菌数的影响

2.1.1 供试液制备 取供试品 10 g，加 pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胍缓冲液稀释，用有隔均质袋拍击约 1 min，制成 1:10 供试液。

2.1.2 菌数测定 取制备好的 1:10 供试液数份，经不同沸水浴时间，分别为 0，15，30，45，60，90 和 120 min，立即冷却。用上述稀释液 10 倍系列稀释至适宜稀释级，接种供试液 1 mL，置直径 90 mm 的无菌平皿中，注入 TSA 培养基，混匀，凝固，33 ℃培养 5 d^[6]。

2.1.3 实验结果 不同沸水浴时间耐热菌数测定结果见表 1。

2.2 120 min 沸水浴处理后存活耐热菌鉴定

2.2.1 实验方法 对经过 120 min 煮沸处理后仍生长的耐热菌进行菌种鉴定，采用 3500 Genetic Analyzer 全自动基因测序系统进行 16S rDNA 基因序列分析。依次对分离得到的微生物进行 DNA 抽提、PCR 扩增、PCR 纯化、标记反应以及标记反应产物纯化，最后进行毛细管测序。

2.2.2 实验结果 存活耐热菌鉴定结果见表 2。

表 1 不同沸水浴时间耐热菌菌数测定结果

Tab. 1 Different boiling bath time influence on the thermoduric bacteria

沸水浴 时间/min	麦冬		芫花	
	耐热菌数/ cfu·g ⁻¹	菌数 lg 值	耐热菌数/ cfu·g ⁻¹	菌数 lg 值
0	990 000	6.0	38 000 000	7.6
15	400	2.6	570 000	5.8
30	70	1.8	81 000	4.9
45	15	1.2	11 200	4.0
60	10	1.0	6 400	3.8
90	<10	<1.0	4 700	3.7
120	<10	<1.0	900	3.0

表 2 120 min 沸水浴处理后耐热菌鉴定结果

Tab. 2 Thermoduric bacteria were identified after 120 min boiling bath

序 号	饮片 名称	基因测序	
		菌名	匹配度/%
1	麦冬	解淀粉芽孢杆菌(ATCC=23 350)	100.00
2	麦冬	萎缩芽孢杆菌(ATCC=49 337)	99.44
3	芫花	解淀粉芽孢杆菌(ATCC=23 350)	99.75
4	芫花	枯草芽孢杆菌(ATCC=6 051)	99.99

2.3 冷藏储存对耐热菌的影响

2.3.1 实验方法 取“2.2”项下经 120 min 沸水浴处理后的供试液，4℃冷藏储存至 48 h，并于 24 h 和 48 h 分别进行菌数测定，按“2.1.2”项下方法测定。

2.3.2 实验结果 2 种饮片冷藏储存一定时间后菌数测定结果见表 3。

表 3 冷藏储存对耐热菌的影响

Tab. 3 Refrigerated storage influence on the thermoduric bacteria

饮片名称	不同储存时间耐热菌数/cfu·g ⁻¹		
	0 h	24 h	48 h
麦冬	<10	<10	<10
芫花	900	750	3 500

3 讨论

由“2.1”项下结果可见，随着沸水浴时间的延长，耐热菌菌数呈现下降趋势，尤其是在最初的 30 min，lg 值下降明显。麦冬供试品溶液经过 60 min 沸水浴处理后，菌落数为 10 cfu·g⁻¹；而芫花供试品溶液即使经过 120 min 沸水浴处理后仍含有较高数量的耐热菌，lg 值达到 3.0。实验结果表明，加热对微生物会有明显的杀灭作用，但部分中药饮片即便经过长时间沸水浴处理后耐热菌数仍较高，对患者存在风险，说明仅将微生物控制的希望寄托在中药饮片服用前的加热处理是不够的，应该结合中药饮片生产工艺，综合考虑药材、生产炮制过程、包装、存储等多方面。

沸水浴处理后耐热菌鉴定的结果均为芽孢杆菌属，芽孢是整个生物界中抗逆性最强的生命体，由于芽孢外层所包裹的疏水性角蛋白(芽孢衣)，对阳离子和水通透性较差，而离子强度较强的皮层可掠夺核心区水分，使芽孢核心部分失水而皮层吸水膨胀，故使得芽孢的抗热性增加，不易杀灭^[7-9]。另外，芽孢是细菌的休眠体，在适宜的条件下芽孢可以重新转变成为营养态细胞，并不断繁殖，给患者的身体健康带来更大的危害^[9]。

由“2.3”项下结果可见，冷藏储存 24 h 后，两种饮片的菌数均无明显变化，48 h 芫花供试液菌数则出现了明显的增加。分析原因，麦冬供试液经 120 min 沸水浴处理后，供试液中已基本无耐热菌存在，基数很低，故即便储存时间延长菌数也无明显变化；而芫花供试液经过 120 min 沸水浴处理后仍有较高数量的耐热菌存在，随着储存时间的延长，菌逐渐复苏生长，从而使得供试液中菌含量显著提高。实验结果表明，目前各大医院提供的代煎服务，目前，一般代煎服务多为提供一次性煎煮 7 d 或 10 d 的汤药，患者将代煎汤药在冰箱中冷藏，连续服用至结束^[10]。但如果煎煮完的汤药中仍存在一定数量的耐热菌，那么冷藏的保存条件并不能抑制耐热菌重新变成营养态细胞，并不断增殖，且药液内多含有淀粉，糖类、蛋白质等成分，正好为微生物的大量繁殖提供了营养条件，对患者来说存在的风险显而易见。

REFERENCES

[1] ZHU Y, Quality safety for dispensed Chinese medicines: causes and solutions [J]. China Pharm(中国药房), 2007, 18(6): 477-478.

[2] XUE C X. Discussion on the causes and countermeasures of mould of TCM cut crude drugs [J]. Clin J Chin Med(中医临床研究), 2013, 5(5): 104-105.

[3] 夏委. 我国中药饮片质量现状与改善策略[J]. 中国药业, 2011, 20(18): 2-4.

[4] 范蕾, 余华丽, 陈芬芳. 中药汤剂代煎情况调查分析[J]. 中国药师, 2012, 15(9): 1360-1362.

[5] 中国药典. 一部[S]. 2015: 155, 159.

[6] 中国药典. 四部[S]. 2015: 140-144.

[7] SETLOW P. Spores of *Bacillus subtilis*: their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals [J]. J Appl Microbiol, 2006, 101(3): 514-525.

[8] 马挺, 刘如林. 嗜热菌耐热机理的研究进展[J]. 微生物学通报, 2002, 29(2): 86-88.

[9] LU M F, ZHANG Y J, ZHANG H Y. Isotope effects on cell growth and sporulation, and spore heat resistance, survival and spontaneous mutation of *Bacillus cereus* by deuterium oxide culture [J]. Afr J Microbiol Res, 2013, 7(8): 604-611.

[10] 张平, 王云涛. 冷藏代煎中药服法浅议[J]. 河北中医, 2008, 30(5): 498-498.

收稿日期: 2016-02-29