

# 复方黄连素片微生物限度检查方法的研究

陈 隽\*

(南通市食品药品监督检验中心, 南通 226006)

**摘要:** **目的** 建立复方黄连素片微生物限度检查法。**方法** 按照《中华人民共和国药典》2020年版四部规定, 采用平皿倾注法、降低检品供试液浓度法、降低检品供试液浓度联合薄膜过滤法等办法依次进行微生物限度检查方法的适用性实验。**结果** 需氧菌计数采用薄膜过滤法, 霉菌和酵母菌计数采用降低检品供试液浓度的方法, 药品标准规定必须检查的三种控制菌采用常规浓度直接接种法。**结论** 本实验拟定的检查方法步骤简单、花费时间短。

**关键词:** 复方黄连素片; 微生物限度; 方法验证; 平皿倾注法; 薄膜过滤法

## Study on microbial limit test for Fufang Huangliansu tablets

CHEN Jun\*

(Nantong Food and Drug Supervision and Inspection Center, Nantong 226006, China)

**ABSTRACT: Objective** To establish the method of microbial limit test of Fufang Huangliansu tablets. **Methods** According to the provisions of Part Four of the 2020 edition of the Pharmacopoeia of the People's Republic of China, the applicability test of microbial limit testing methods shall be gradually carried out using methods such as plate pouring method, increasing dilution ratio, and dilution combined with membrane filtration. **Results** The membrane filtration method was used for aerobic bacteria counting. The medium dilution method was used for counting total combined molds and yeasts. The direct inoculation method was used for three types of control bacteria that must be tested according to drug standards. **Conclusion** The microbiological limit test method for this drug proposed in this experiment is simple and easy to implement.

**KEY WORDS:** Fufang Huangliansu tablets; microbial limit; validation of method; plate pouring method; membrane filtration method

## 0 引言

复方黄连素片为国家医保甲类中成药<sup>[1]</sup>, 是中西药复方制剂, 常用于证属大肠湿热的泻痢<sup>[2]</sup>。根据其处方组成、制法及用药途径, 应进行需氧菌总数、霉菌和酵母菌总数的测定及沙门菌、大肠埃希菌和耐胆盐革兰阴性菌的检查<sup>[3]</sup>。据相关文献报道, 复方黄连素片处方中的三种中药及一种西药都具有较强的抑菌性<sup>[4-5]</sup>, 但其对微生物限度检查的干扰程度不清楚。近年报道, 采用适当的方法可以消除药物

的抑菌作用, 使检验结果更准确<sup>[6-17]</sup>。本文采用依次渐进的方法来寻找并验证最合适的微生物限度检查方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要仪器

AC2-6S1 型生物安全柜(益世科生物科技有限公司);  
ACB-6E1 型超净工作台(益世科生物科技有限公司);  
IGS180 微生物培养箱(赛默飞世尔科技中国有限公司);  
KB240 型霉菌培养箱(德国宾德 binder)。

\*通信作者: 陈隽, 主管药师, 研究方向为中西药品监督检验检测。E-mail: 584105425@qq.com

\*Corresponding author: CHEN Jun, Chief pharmacist, Nantong Food and Drug Supervision and Inspection Center, Nantong 226006, China. E-mail: 584105425@qq.com

## 1.2 培养基及稀释剂

0.9%氯化钠溶液, 本中心自配, 灭菌。实验所用各种培养基均由青岛海博生物技术有限公司生产, 经过适用性检查, 符合要求《中国药典》2020年版四部规定。

## 1.3 实验菌种

实验所用5种试验菌均购自中国食品药品检定研究院。试验用菌株均为第3代。

## 1.4 样品

复方黄连素片, 通化爱心药业股份有限公司生产, 批号: 221101-31。

## 1.5 试验条件和方法

### 1.5.1 试验菌液制备

取经30~35℃培养18~24小时的金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、大肠埃希菌、枯草芽孢杆菌的液体培养物用0.9%无菌氯化钠溶液制备成每1 mL含菌数不大于100 cfu的菌悬液, 备用;

取经20~25℃培养2~3天的白色念珠菌液体培养物用0.9%无菌氯化钠溶液制备成每1 mL含菌数不大于100 cfu的菌悬液, 备用。

取黑曲霉的新鲜培养物加入适量含0.05% (mL/mL) 聚山梨酯80的0.9%无菌氯化钠溶液, 将孢子洗脱。然后, 吸出孢子悬液用含0.05% (mL/mL) 聚山梨酯80的0.9%无菌氯化钠溶液制成适宜浓度的黑曲霉孢子悬液。

### 1.5.2 供试液的制备方法

取样品10 g, 加pH7.0无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液研细稀

释至100 mL, 匀浆, 静置, 取上清液作为1:10的供试液。

(1)培养基稀释法: 取1:10的供试液1 mL至5个平皿中, 每个平皿0.2 mL。

(2)薄膜过滤法: 分别取1:10的供试液于无菌离心管中离心, 转速为500转/分钟, 离心时间为5分钟, 吸取上清液1 mL过滤在1张薄膜上, 用无菌pH7.0氯化钠-蛋白胨缓冲液冲洗, 100 mL/次, 共5次。

### 1.5.3 微生物回收试验

试验组: 取上述制备好的供试液, 分别加入各种试验菌液, 混匀, 使供试液含菌量≤100 cfu/mL或每张滤膜所过滤的供试液。

供试品对照组: 取制备好的供试液, 以稀释液代替菌液同试验组操作。

菌液对照组: 取稀释液替代供试液, 按试验组操作加入试验菌液并分别进行各微生物回收试验。

3次独立的平行试验, 按照《中国药典》2020年版四部<sup>[3]</sup>规定, 枯草芽孢杆菌、铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌、白色念珠菌和黑曲霉分别置各自规定温度, 规定培养时间培养, 观察菌落生长情况, 点计平板上生长的所有菌落数, 计算各试验菌回收比值。

## 2 结果与分析

### 2.1 需氧菌计数、霉菌和酵母菌计数

#### 2.1.1 培养基稀释法

复方黄连素片中含有抑菌物质, 故首先采用培养基稀释法进行测定, 结果见表1:

表1 平皿倾注法试验结果

Table 1 Test results of the flat dish pouring method

阳性菌	试验组(cfu/mL)	菌液对照组(cfu/mL)	供试品对照组(cfu/mL)	回收比值
金黄色葡萄球菌	23	84	0	0.274
铜绿假单胞菌	40	41	0	0.976
枯草芽孢杆菌	7	82	0	0.085
白色念珠菌	76	92	0	0.826
黑曲霉	30	41	0	0.732

结果表明, 金黄色葡萄球菌和枯草芽孢杆菌回收比值均小于0.5, 表明复方黄连素片有较强的抑制作用, 不能采用培养基稀释法进行测定。

#### 2.1.2 薄膜过滤法

根据培养基稀释法预试验结果显示, 复方黄连素片对需氧菌有较强的抑制作用, 采用薄膜过滤法进行进一步试验, 结果见表2:

表2 薄膜过滤法试验结果  
Table 2 Test results of membrane filtration method

阳性菌	试验组(cfu/mL)	菌液对照组(cfu/mL)	供试品对照组(cfu/mL)	回收比值
铜绿假单胞菌	33	35	0	0.943
金黄色葡萄球菌	40	51	0	0.784
枯草芽孢杆菌	41	49	0	0.837

结果表明,铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌采用薄膜过滤法回收比值均大于0.5,表明经采用薄膜过滤法能有效消除复方黄连素片对细菌的抑制作用,采用薄膜过滤法进行需氧菌计数测定应可行。

根据上述实验,确定复方黄连素片需氧菌计数方法为薄膜过滤法,霉菌和酵母菌计数方法为培养基稀释法。

## 2.2 控制菌检测

菌液制备同1.5.1。

### 2.2.1 耐胆盐革兰阴性菌

试验组:取供试品10g,加胰酪大豆胨液体培养基至100mL,用匀浆机匀浆,制成1:10的供试液,进行培养。培养温度:20~25℃,培养时间:2小时。然后取10mL上述培养物分别加入2瓶100mL肠道菌增菌液体培养基中,同时分别加入大肠埃希菌10~100cfu、铜绿假单胞杆菌10~100cfu,进行培养。培养温度:30~35℃,培养时间:24~48小时。最后将培养物划线于紫红胆盐葡萄糖琼脂培养基上,进行培养。培养温度:30~35℃,培养时间:18~24小时。分别观察其菌落形态。

阴性对照组:以稀释液代替供试液,方法同试验组。

耐胆盐革兰阴性菌试验,结果见表3:

表3 耐胆盐革兰阴性菌试验结果  
Table 3 Results of bile salt resistant Gram negative bacteria test

阳性菌	试验组	阴性对照组
大肠埃希菌	+	-
铜绿假单胞菌	+	-

结果表明,经采用常规法对耐胆盐革兰阴性菌无抑制作用,采用常规菌法进行耐胆盐革兰阴性菌检查应可行。

### 2.2.2 大肠埃希菌

试验组:取1:10供试液10mL接种至100mL胰酪大豆胨液体培养基中,同时加入大肠埃希菌10~100cfu,再取1mL培养物接种于100mL麦康凯液体培养基中,42~44℃培养24~48小时。最后将培养物划线于麦康凯琼脂培养基上,进行鉴别培养。培养温度:30~35℃,培养时间:18~72小时。观察其菌落形态。

阴性对照组:以稀释液代替供试液,方法同试验组。大肠埃希菌试验,结果见表4:

表4 大肠埃希菌试验结果  
Table 4 Results of escherichia coli test

阳性菌	试验组	阴性对照组
大肠埃希菌	+	-

结果表明,经采用常规法对大肠埃希菌无抑制作用,采用常规菌法进行大肠埃希菌检查应可行。

### 2.2.3 沙门菌

试验组:取10g供试品接种至200mL胰酪大豆胨液体培养基中,同时加入沙门菌10~100cfu,进行培养。培养温度:30~35℃,培养时间:18~24小时。再取0.1mL培养物接种于10mL RV沙门菌增菌液体培养基中,进行培养。培养温度:30~35℃,培养时间:18~24小时。最后将培养物划线于木糖赖氨酸脱氧胆酸盐琼脂培养基上,进行培养。培养温度30~35℃,培养时间:18~48小时。观察其菌落形态。

阴性对照组:以稀释液代替供试液,方法同试验组。

沙门菌试验,结果见表5:

表5 沙门菌试验结果  
Table 5 Results of salmonella test

阳性菌	试验组	阴性对照组
沙门菌	+	-

结果表明,经采用常规法对沙门菌无抑制作用,采用常规法进行沙门菌检查应可行。

## 3 讨论与结论

本研究通过薄膜过滤法进行需氧菌计数,通过培养基稀释、降低检品供试液浓度的方法进行霉菌和酵母菌计数,采用常规浓度直接接种法进行大肠埃希菌、沙门菌和耐胆盐革兰阴性菌的检查。方法步骤简单、花费时间短,具有高度的重复性和准确性。

单味中药的化学成分及其活性成分极其复杂,其产地、采收时间、炮制加工等因素也对其有较大的影响。中成药

制剂处方组成少则几味,多则几十味,各厂家生产工艺也不尽相同,使得中成药的抑菌活性具有不确定性。鉴于此,各厂家各品种必须以各自适用性试验的结果作为微生物限度检查的依据。

## 参考文献

- [1] 国家医疗保障局. 关于印发《国家基本医疗保险、工伤保险和生育保险药品目录(2022年)》的通知[EB/OL]. [2023-01-18]. [http://www.nhsa.gov.cn/art/2023/1/18/art\\_104\\_10078.html](http://www.nhsa.gov.cn/art/2023/1/18/art_104_10078.html) [2024-01-18].
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(2020年版一部)[M]. 北京:中国医药科技出版社,2020:1338.
- [3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(2020年版四部)[M]. 北京:中国医药科技出版社,2020:160-175.
- [4] 刘翔,马林,吕东元,等. 33种药用及食用香料植物的抑菌活性研究[J]. 安徽农业科学,2009,37(08):3580-3582.
- [5] 乔海霞,甄攀,李秀娟,等. 吴茱萸提取物体外抗菌作用初步研究[J]. 河北北方学院学报(医学版),2009,26(01):27-29.
- [6] 中国食品药品检定研究院. 中国药品检验标准操作规范[M]. 北京:中国医药科技出版社,2019:44.
- [7] 曹鲁娜,赵蕊蕊,武玲,等. 6组同方同效不同剂型中成药的微生物限度检查方法[J]. 中国药物经济学,2023,18(03):95-100.
- [8] 牛萌萌,姬俊,王立云,等. 感冒清热颗粒微生物限度检查及质量分析[J]. 中国药品标准,2023,24(05):525-528.
- [9] 蔡金莲,郭智聪,黄婉锋. 4批抗病毒口服液抑菌效力测定与评价[J]. 海峡药学,2022,34(10):48-51.
- [10] 刘广楨,胡文红,徐晓洁,等. 复方黄连素片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,2014,34(01):64-70.
- [11] 李东娟,杜春华,张晓南,等. 盐酸小檗碱片微生物限度检查方法研究[J]. 云南中医中药杂志,2019,40(10):72-74.
- [12] 顾金花,袁凤娟,张明君,等. 5种维药蜜膏制剂微生物限度检查法的建立与结果分析[J]. 食品安全质量检测学报,2019,10(02):515-520.
- [13] 张小华,马新换,汪付田,等. 2种医院制剂微生物限度检查方法学适用性研究[J]. 中国药事,2019,33(08):949-953.
- [14] 袁力,孙新皓,陶明,等. 护肝片和护肝胶囊的微生物限度检查方法研究及质量分析[J]. 中国药物评价,2021,38(03):213-218.
- [15] 李翔,黎春彤,王晶,等. 4种医院液体制剂微生物限度检验方法的建立[J]. 中国药师,2019,22(6):1183-1185.
- [16] 任仲丽. 浅析药品微生物限度检查和食品微生物检验的差异[J]. 中国标准化,2022,(14):131-133,140.
- [17] 周文君,刘爱明. 不同药品的微生物限度检验方法验证的对比分析[J]. 家庭医药. 就医选药,2017,(09):46.

## 作者简介



陈隽,主管药师,研究方向为中、西药品监督检验检测。