

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2020.09.035

6种中药饮片微生物检测状况分析*

李艳¹, 周剑^{2△}, 刘霞³, 朱照静¹

(1. 重庆医药高等专科学校, 重庆 401331; 2. 重庆市食品药品检验检测研究院, 重庆 401121;
3. 重庆市綦江区人民医院, 重庆 401420)

摘要:目的 分析6种中药饮片的微生物检测情况,为合理制订中药饮片微生物限度提供参考。方法 按2015年版《中国药典(四部)》微生物限度检查法,测定6种中药饮片中需氧菌总数(TAMC)、霉菌和酵母菌总数(TYMC)、耐热菌数、耐胆盐革兰阴性菌、沙门菌,并采用全自动微生物鉴定及药敏分析系统对分离到的菌株进行鉴定。结果 6种中药饮片中需氧菌、霉菌和酵母菌、耐热菌、耐胆盐革兰阴性菌检出率均为100.00%,均未检出沙门菌,检出玫瑰色库克菌、缓慢葡萄球菌、少动鞘氨醇单胞菌、浅绿气球菌等。结论 中药饮片种类繁多,应根据不同炮制工艺及给药途径分类建立微生物限度标准。

关键词: 中药饮片;微生物;熟地黄;酒萸肉;六味地黄丸

中图分类号:R932;R286.0

文献标识码:A

文章编号:1006-4931(2020)09-0117-04

Analysis of Microbiological Test Results of 6 Kinds of Chinese Herbal Pieces

LI Yan¹, ZHOU Jian², LIU Xia³, ZHU Zhaojing¹

(1. Chongqing Medical and Pharmaceutical College, Chongqing, China 401331; 2. Chongqing Institute for Food and Drug Control, Chongqing, China 401121; 3. Chongqing Qijiang District People's Hospital, Chongqing, China 401420)

Abstract: Objective To analyze the microbiological test results of 6 kinds of Chinese herbal pieces and provide reference for the microbial limit standard. **Methods** According to Chinese Pharmacopoeia(2015 edition), the total number of aerobic bacteria(TAMC), total mold and yeast(TYMC), heat-resistant bacteria count, bile-tolerant Gram-negative bacteria and Salmonella were determined, and the isolated strains were identified by automated microbial identification and drug susceptibility analysis system. **Results** The detection rates of aerobic bacteria, mold and yeast, heat-resistant bacteria and bile-tolerant Gram-negative bacteria in 6 kinds of Chinese herbal pieces were 100.00% and salmonella was not detected. In addition, rose Cochlear, Staphylococcus aureus, sphingomonas and light green balloon were detected. **Conclusion** There are many kinds of Chinese herbal pieces, and microbial limit standards should be established according to different processing methods and administration routes.

Key words: Chinese herbal pieces; microorganism; prepared Radix rehmanniae; Cornus officinalis; Liuwei Dihuang Pills

2015年版《中国药典》首次收载中药饮片的微生物限度标准,对研粉口服用贵细饮片、直接口服及泡服饮片规定了沙门菌、耐胆盐革兰阴性菌的限度,其他类型饮片暂无微生物控制要求。近年来,国家药典委员会、各级药品监督管理局及药检所等机构都相继组织开展了中药饮片的微生物限度检测及相关课题研究^[1-7]。熟地黄、酒萸肉、牡丹皮、山药、茯苓、泽泻是中医临床常见可直接使用的中药饮片,也是六味地黄丸、金匱肾气丸等中药制剂的处方成分。本研究考察了重庆市最大中药材批发市场销售的以上6种共36批中药饮片的微生物负载情况,为合理制订中药饮片微生物限度提供参考,同时为课题组后期开展微生物对六味地黄丸主要有效成分的影响作好前期工作。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

仪器:VITEK2 COMPACT型全自动生化鉴定仪(生

物梅里埃中国有限公司);AⅡ型生物安全柜(上海力康生物医疗科技控股有限公司);SHH150L型生化培养箱(重庆四达试验设备有限公司);BX61型生物显微镜(日本Olympus公司)。

试药:熟地黄共6批,来源于重庆、河南;酒萸肉共6批,来源于安徽、浙江、河北;牡丹皮共6批,来源于安徽;山药共6批,来源于四川、河南;茯苓共6批,来源于四川、云南、安徽;泽泻共6批,来源于四川、福建。样品经重庆市食品药品检验检测研究院中药室杨帆副主任药师鉴定为正品。

培养基与菌株:胰酪大豆胨液体培养基、胰酪大豆胨琼脂培养基、沙氏葡萄糖琼脂培养基、肠道菌增菌液体培养基、紫红胆盐葡萄糖琼脂培养基、RV沙门增菌液体培养基及木糖赖氨酸脱氧胆酸盐琼脂培养基,均购自中国食品药品检定研究院。

枯草芽孢杆菌[CMCC(B)63501]、金黄色葡萄球菌

*基金项目:重庆市卫生计生委中医药科技项目[ZY201703074]。

第一作者:李艳,女,硕士研究生,讲师,研究方向为药物分析和药品质量标准,(电子信箱)157658902@qq.com。

△通信作者:周剑,男,大学本科,副主任药师,研究方向为药品微生物检验,(电子信箱)40257199@qq.com。

[CMCC(B)26003]、大肠埃希菌[CMCC(B)44102]、乙型副伤寒沙门菌[CMCC(B)50094]、铜绿假单胞菌[CMCC(B)10104]、白色念珠菌[CMCC(F)98001]、黑曲霉[CMCC(F)98003],均购自中国食品药品检定研究院。

1.2 方法

1.2.1 菌液制备^[8]

根据2015年版《中国药典(四部)》通则1107,制备枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、乙型副伤寒沙门菌、铜绿假单胞菌、白色念珠菌的菌悬液、黑曲霉的孢子悬液。

1.2.2 供试液制备

取各批中药饮片适量,无菌粉碎,称取10 g,加灭菌胰酪大豆胨液体培养基至100 mL,使浓度为1:10,备用。

1.2.3 微生物计数

取1.2.2项下供试液,依次10倍递增稀释至1:10 000,分别吸取1:10供试液及1:100,1:1 000,1:10 000稀释级样品匀液1 mL置平皿中,每个稀释级平行制备2个平皿。同时,分别吸取1 mL空白稀释液置2个平皿,作为空白对照。立即倒入46℃琼脂培养基,待凝固后,置规定温度[需氧菌采用胰酪大豆胨琼脂培养基(TSA)平板,培养温度为33℃,培养5 d;霉菌和酵母菌采用沙氏葡萄糖琼脂培养基(SDA)平板,培养温度为25℃,培养7 d]培养,观察结果。

另取1.2.2项下供试液,置沸水浴30 min后迅速冷却,依次10倍递增稀释至1:10 000,分别吸取各稀释级样品匀液1 mL置平皿中,每个稀释级平行制备2个平皿。立即倾注胰酪大豆胨琼脂培养基,凝固后,33℃培养5 d,测定耐热菌数。

1.2.4 耐胆盐革兰阴性菌

分别取1:10供试液及1:100,1:1 000稀释级样品匀液1 mL,接种至10 mL肠道菌增菌液体培养基中,35℃培养48 h,取上述培养物分别划线接种于紫红胆盐葡萄糖琼脂培养基上,35℃培养24 h。同时取稀释液1 mL置10 mL肠道菌增菌液体培养基中,与样品平行试验,做阴性对照,观察结果。

1.2.5 沙门菌

取各粉碎后的供试品10 g,置200 mL胰酪大豆胨液体培养基中,35℃培养24 h,取上述培养物0.1 mL接种于10 mL RV沙门增菌液体培养基中,35℃培养48 h,分别划线接种于木糖赖氨酸脱氧胆酸盐培养基平板,35℃培养72 h,观察结果。

阳性对照:取各粉碎后的供试品10 g,加入沙门菌[CMCC(B)50094]1 mL(含菌量约10~100 cfu/mL),与样品平行试验,观察结果。

阴性对照:取稀释液10 mL,置200 mL胰酪大豆胨

液体培养基中,与样品平行试验,观察结果。

1.2.6 菌落鉴定

挑取需氧菌总数项下TSA平板生长单个菌落,划线于TSA平板,35℃培养24 h,备用,待检。取沙门菌检查项下胰酪大豆胨液体培养基培养物,划线于TSA平板,35℃培养24 h,挑取上述平板单个菌落,划线于TSA平板,35℃培养24 h,备用,待检。将上述备用待检平板培养物,采用生物梅里埃VITEK2 COMPACT全自动生化鉴定仪进行分析,确认污染菌种类。

1.2.7 统计学处理

原始数据转换为对数值,以对数值表示,采用SPSS 17.0统计学软件进行分析。

2 结果

2.1 需氧菌总数计数结果

6种饮片共36批样品的TAMC检查结果见表1。可见,36批饮片样品的总体平均lgTAMC值为1.7,最小值为0.5,最大值为3.2,表明饮片样品的TAMC整体水平满足《欧洲药典》^[9]、《美国药典》^[10]和《日本药典》^[11]关于中药饮片微生物限度的标准要求。以饮片样品名称为横坐标、lgTAMC值为纵坐标作箱式图,结果见图1。可见,6种饮片中,牡丹皮的总体数值最高,污染水平较高;泽泻、熟地黄、酒萸肉的整体污染水平较牡丹皮低,推测应与其炮制方式有关;茯苓和山药的总值最低,且数值分布均较窄,表明这2个品种污染水平低,且均匀性较好,质量较稳定。

表1 饮片样品的TAMC检查结果

饮片名称	lgTAMC	均值	中值
牡丹皮	2.5~3.2	2.9	2.8
泽泻	1.8~2.6	2.2	2.2
熟地黄	1.5~2.3	1.9	1.9
酒萸肉	0.9~1.6	1.5	1.2
茯苓	0.7~1.3	1.0	1.0
山药	0.5~1.2	0.9	0.8

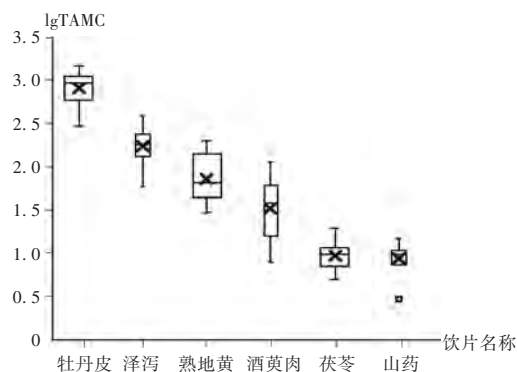


图1 饮片样品lgTAMC箱式图

2.2 霉菌和酵母菌总数计数

6种饮片的霉菌和酵母菌总数计数平均结果均低

于 10 cfu/g , 故未单独进行列表和作图。结果表明, 6 种饮片的 TYMC 负载均较低, 满足《欧洲药典》《美国药典》《日本药典》的要求。检验结果较预期偏低, 可能与该 6 种饮片的性质与炮制方式有关, 也可能与中药饮片生产厂家为了降低微生物数量及活性, 生产过程中采用射线辐照等方式进行灭菌处理相关。

2.3 耐热菌数计数 (NAIRE)

6 种饮片共 36 批样品, 总体平均 $\lg\text{NAIRE}$ 值为 1.1, 最小值为 0.5, 最大值为 2.3, 详见表 2。由表 1 和表 2 可见, 经沸水浴热处理 30 min 后需氧菌负载均比未热处理时小, 但均能检出需氧菌, 提示中药饮片即使经煎煮后也仍存在微生物污染的风险。以饮片样品名称为横坐标、 $\lg\text{NAIRE}$ 值为纵坐标作箱式图, 结果见图 2。可见, 牡丹皮和泽泻的 $\lg\text{NAIRE}$ 值较表 1 和图 1 中 $\lg\text{TAMC}$ 值明显降低, 表明经煎煮后, 可杀灭牡丹皮和泽泻中相当部分的需氧菌。熟地黄、酒萸肉、茯苓、山药的 $\lg\text{NAIRE}$ 降低则不如前两者明显, 分析原因可能是因为熟地黄、酒萸肉饮片在炮制过程中已用高温蒸制, 故煎煮后需氧菌负载变化不明显; 而茯苓和山药需氧菌负载均较低, 故煎煮后变化也不明显。

表 2 饮片样品的耐热菌检查结果

饮片名称	$\lg\text{NAIRE}$	均值	中值
牡丹皮	0.5 ~ 2.1	1.1	1.3
泽泻	0.6 ~ 2.3	1.4	1.5
熟地黄	1.0 ~ 2.0	1.7	1.5
酒萸肉	0.6 ~ 1.8	1.3	1.2
茯苓	0.6 ~ 1.3	0.9	1.0
山药	0.5 ~ 1.0	0.7	0.8

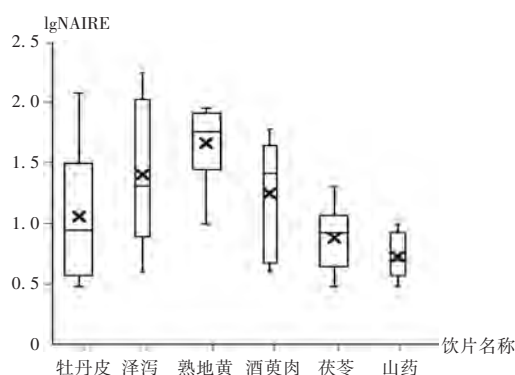


图 2 饮片样品 $\lg\text{NAIRE}$ 箱式图

2.4 耐胆盐革兰阴性菌

耐胆盐革兰阴性菌计数结果 (N) $< 10 \text{ cfu/g}$ 以 $\lg$ 值 0.5 计, $10 \text{ cfu/g} < N < 10^2 \text{ cfu/g}$ 以 $\lg$ 值 1.5 计, $10^2 \text{ cfu/g} < N < 10^3 \text{ cfu/g}$ 以 $\lg$ 值 2.5 计, 以此类推。以饮片样品名称为横坐标、 N 转化值为纵坐标作箱式图, 结果见图 3。6 种饮片中, 牡丹皮与茯苓检出耐胆盐革兰阴性菌计数均为 $N < 10 \text{ cfu/g}$, 其余 4 种饮片仅有熟地

黄和酒萸肉各有 1 批次为 $10^2 \text{ cfu/g} < N < 10^3 \text{ cfu/g}$, 均值为 $10 \text{ cfu/g} < N < 10^2 \text{ cfu/g}$, 检查结果符合 2015 年版《中国药典(四部)》通则 1107 中对中药提取物控制菌的规定^[8]。

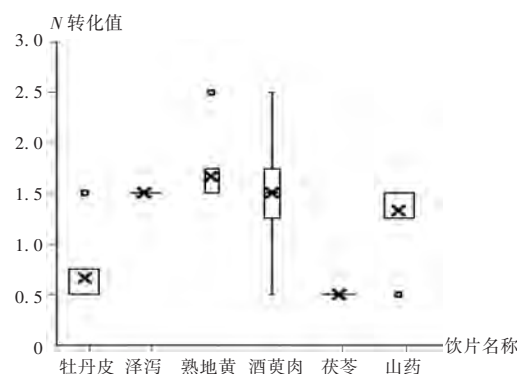


图 3 饮片样品耐胆盐革兰阴性菌箱式图

2.5 沙门菌

所有样品均未检出沙门菌。

2.6 样品含微生物种类鉴定情况

按 1.2.6 项下操作, 牡丹皮中检出玫瑰色库克菌、缓慢葡萄球菌、少动鞘氨醇单胞菌、放射根瘤菌; 泽泻中检出浅绿气球菌、缓慢葡萄球菌、少动鞘氨醇单胞菌、放射根瘤菌; 熟地黄中检出泛菌属, 酒萸肉中检出浅绿气球菌; 茯苓中检出产色葡萄球菌; 山药中检出泛菌属、缓慢葡萄球菌、少动鞘氨醇单胞菌。上述微生物主要为自然环境和人体中常见的微生物, 在药品生产、运输、保存过程中, 进行微生物污染种类分析, 常能分离检出, 其中浅绿气球菌常于医院环境分离检出, 推测为特殊污染批次。

3 讨论

参照 2015 年版《中国药典(四部)》非无菌药品微生物限度标准关于中药饮片检验项目、限度标准相关规定, 按非无菌药品微生物计数及控制菌检查法进行检测, 结果符合《欧洲药典》《美国药典》《日本药典》及现行《中国药典》同类标准的规定。

6 种饮片 36 批样品中, 牡丹皮和泽泻需氧菌总数相对较高, 熟地黄和酒萸肉居中, 茯苓和山药较低; 6 种饮片的霉菌和酵母菌总数计数平均结果均较低; 经煎煮后, 牡丹皮和泽泻需氧菌总数降低最明显, 熟地黄、酒萸肉、茯苓和山药前后变化较小。分析 6 种饮片的炮制方式, 熟地黄和酒萸肉在炮制过程中均有高温蒸制过程, 故饮片在煎煮前后需氧菌负载变化不明显; 牡丹皮和泽泻则无高温蒸制过程, 故饮片在煎煮前后需氧菌负载变化较明显; 而茯苓和山药则可能因为污染水平低, 质量较稳定, 故煎煮前后需氧菌负载均较低。耐胆盐革兰阴性菌整体检出水平均较低, 沙门菌均未检出。分离鉴定出的其他微生物为自然环境和人体中常见的微生物种类。

6 种饮片 36 批样品中, 所检出微生物数量较预期偏