

中图分类号: R927.1 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2026)02-0100-04
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2026.02.021



一种低 pH 中药制剂微生物限度检查方法转移失败原因分析*

马晓娟, 王雯, 张亚珍, 李辉[△]

(陕西盛德泰林生物安全技术检测有限公司, 陕西 西安 710065)

摘要:目的 分析一种低 pH (< 6.5) 中药制剂微生物限度检查方法转移失败的原因。方法 记录 3 个品牌 4 批 (A, B, C₁, C₂) 胰酪大豆胨琼脂培养基 (TSA) 的金黄色葡萄球菌 (简称金葡菌) 菌落数, 并以对照培养基为参照, 计算回收率。制备 SFYX - G (1:10, g/mL), SFYX - G (1:100, g/mL), 感特灵胶囊 (1:10, g/mL), 辅料混合脂肪酸甘油酯 (1:10, g/mL) 供试液, 测定其 pH; 制备金葡菌供试液, 以 3 个品牌 4 批 TSA 培养金葡菌, 记录菌落数, 并以菌液为参照, 计算回收率。实验设菌液对照、中和剂对照及阴性对照。结果 A 批、B 批 TSA 的金葡菌回收率分别为 0.95, 0.97, 均大于 C₁ 批、C₂ 批的 0.70, 0.64。SFYX - G (1:10, g/mL) 及感特灵胶囊 (1:10, g/mL) 供试液 pH 均低于 6.4, 且接种金葡菌的上述 2 种供试液在 C₁ 和 C₂ 批 TSA 上的回收率为 0~0.28, 均未达到 2020 年版《中国药典 (四部)》标准 (0.5~2.0); 其他供试液回收率为 0.74~1.35, 达标。结论 建立低 pH 中药制剂微生物限度检查方法时, 应注意在方法验证时确定好培养基品牌后在日常的检验检测中不轻易更换, 如确需更换培养基品牌, 需对方法进行确认复核, 以避免方法转移失败。

关键词: 低 pH; 中药制剂; 胰酪大豆胨琼脂培养基; 微生物限度检查; 金黄色葡萄球菌; 方法转移

Analysis of the Reasons for Transfer Failure of Microbial Limit Test Method of A Low - pH Traditional Chinese Medicine Preparation

MA Xiaojuan, WANG Wen, ZHANG Yazhen, LI Hui[△]

(Shaanxi Shengdetailin Biosafety Technology Testing Co., Ltd., Xi'an, Shaanxi 710065, China)

Abstract: Objective To analyze the reasons for transfer failure of microbial limit test for a low - pH (< 6.5) traditional Chinese medicine (TCM) preparation. **Methods** The colony counts of *Staphylococcus aureus* on four batches (A, B, C₁, C₂) of tryptic soy agar (TSA) from three brands were recorded, with the control medium as the reference, and the recovery rates were calculated. Test solutions of SFYX - G (1:10, g/mL), SFYX - G (1:100, g/mL), Ganteling Capsules (1:10, g/mL), and the mixed fatty acid glycerides (1:10, g/mL) were prepared, and their pH were measured. A test solution of *Staphylococcus aureus* was prepared and cultured on the four batches of TSA from three brands. The colony counts were recorded, with the bacterial solution as the reference and calculated the recovery rates. Bacterial solution control, neutralizer control and negative control were set up in the experiment. **Results** The recovery rates of *Staphylococcus aureus* on TSA batches of A and B were 0.95 and 0.97, respectively, which were both higher than those on batches of C₁ and C₂ (0.70 and 0.64). The pH of the test solutions of SFYX - G (1:10, g/mL) and Ganteling Capsules (1:10, g/mL) were both lower than 6.4, and the recovery rates of above two test solutions inoculated with *Staphylococcus aureus* on TSA batches of C₁ and C₂ were 0 - 0.28, failing to meet the standards of the *Chinese Pharmacopoeia* (2020 Edition, Volume IV) (0.5 - 2.0). The recovery rates of other test solutions were 0.74 - 1.35, which met the standards. **Conclusion** When establishing a microbial limit test method for low - pH traditional Chinese medicine preparations, attention should be paid to not easily changing the culture medium brand during daily inspection and testing after determining it during method validation. If it is necessary to change the culture medium brand, the method should be confirmed and reviewed to avoid method transfer failure.

Key words: low - pH; traditional Chinese medicine preparation; tryptic soy agar; microbial limit test; *Staphylococcus aureus*; method transfer

药品微生物计数方法的可靠性直接影响药品质量和安全。2020年版《中国药典(四部)》要求对有微生物限度标准的非无菌制剂及其原辅料进行微生物限度检查方法适用性验证或确认^[1-3]。胰酪大豆胨琼脂培养基 (TSA) 为方法验证中需氧菌检测、环境监测常用的培养

基^[4], 灵敏度高, 检出率良好, 已广泛应用于微生物的监测和控制^[5], 其质量直接影响微生物检测结果的准确性。目前市售商品化 TSA 所用配方一致, 但由于生产工艺、原材料等方面的差异, 即使同一品种的不同品牌、不同批次的 TSA 质量也可能存在较大差异^[6]。微生物分

* 基金项目: 陕西省创新能力支撑计划项目 [2023 - CX - PT - 42]。

第一作者: 马晓娟, 女, 大学本科, 中级工程师, 研究方向为药品微生物控制, (电子信箱) m215816348@163.com。

[△] 通信作者: 李辉, 男, 硕士, 副主任药师, 研究方向为中药微生物控制, (电子信箱) flywithme@163.com。

析方法转移是指方法接收实验室需采用方法转移实验室建立并经过验证的非法定方法检测样品。SFYX - G 是某企业生产的一种低 pH 中药颗粒剂,本实验室已为该样品建立了微生物限度检查方法,但企业以此方法进行方法转移确认时发现,金黄色葡萄球菌(简称金葡菌)的回收率未达到2020年版《中国药典(四部)》标准(0.5 ~ 2.0)。而方法转移失败一般与菌种活性、培养基质量、供试液本身特性等有关。为此,本研究中比较了不同 TSA 和供试液中金葡菌的回收率,以分析微生物限度检查方法转移失败可能的原因。

1 材料

1.1 仪器

MJ - 78A 型全自动高压蒸汽灭菌器(施都凯仪器设备 <上海> 有限公司);XY500J 型电子天平(常州市幸运电子设备有限公司,精度为 0.01 g);HFsafe - 1500LC 型 B2 生物安全柜(上海力申科学仪器有限公司);LRH - 250F 型生化培养箱(上海一恒科学仪器有限公司);PHS - 3C 型 pH 计(上海仪电科学仪器股份有限公司)。

1.2 试药、培养基、菌种

试药:SFYX - G(企业 A,批号为 20230816);感特灵胶囊(西安澜泰药业有限公司,批号为 20231201);混合脂肪酸甘油酯(硬脂)(天津信诚康达药业有限公司,批号为 220901);其余试剂均为分析纯,水为超纯水。

TSA: 品牌 A(批号为 231120);品牌 B(批号为 240718A10);品牌 C(C₁ 批号为 20231130, C₂ 批号为 20240418);对照 TSA(中国食品药品检定研究院,批号为 135025 - 202406)。

菌种:金葡菌 *Staphylococcus aureus* [保藏编号为 CMCC(B)26003,批号为 9a6 - 1,购自中国食品药品检定研究院],工作菌株为第 2 代(临用前按 2020 年版《中国药典》中的方法分别制成含菌量 $\leq 1 \times 10^4$ cfu / mL 和 ≤ 100 cfu / mL 的菌悬液)。

2 方法与结果

2.1 培养基考察

pH:按处方称取、配制 TSA, 121 °C, 湿热灭菌(15 min)后冷却至 25 °C,采用 pH 计测定 3 个品牌 4 批 TSA 的 pH,重复 3 次,结果不同品牌 TSA 的 pH 存在差异,且品牌 C 不同批次间也存在差异。详见表 1。

金葡菌回收率:根据 2020 年版《中国药典(四部)》通则 1105 微生物限度检查方法,考察金葡菌在 TSA 中的生长情况。采用平皿法,取含菌量 ≤ 100 cfu / mL 的金葡菌菌悬液 1 mL 接种至平皿中,分别倾倒入各 TSA 与

表 1 各品牌 TSA 的 pH 测定结果(n = 3)

Tab. 1 Results of pH measurement in TSA from different brands (n = 3)

培养基	1	2	3	\bar{X}
A	7.32	7.32	7.32	7.32
B	7.16	7.16	7.16	7.16
C ₁	7.05	7.05	7.04	7.05
C ₂	7.32	7.32	7.32	7.32

对照 TSA, 30 ~ 35 °C 培养 3 d, 记录平均菌落数, 计算回收率, 回收率 = 被检 TSA 上的菌落数 / 对照 TSA 上的菌落数。重复 3 次, 结果各 TSA 平均回收率均达标, 且品牌 A、B TSA 上的金葡菌回收率明显高于品牌 C, 但品牌 C 不同批号 TSA 之间差异不明显。详见表 2。

表 2 各品牌 TSA 金葡菌菌落数及回收率结果(n = 3)

Tab. 2 Results of colony counts and recovery rates of *Staphylococcus aureus* in TSA from different brands (n = 3)

TSA 品牌	序号	菌落数 (cfu)	回收率	\bar{X}
对照	1	49		
	2	50		
	3	66		
A	1	51	1.04	0.95
	2	45	0.90	
	3	61	0.92	
B	1	57	1.16	0.97
	2	39	0.78	
	3	65	0.98	
C ₁	1	34	0.69	0.70
	2	37	0.74	
	3	45	0.68	
C ₂	1	31	0.63	0.64
	2	32	0.64	
	3	43	0.65	

2.2 供试液考察

供试液制备:取 SFYX - G、感特灵胶囊各 10 g, 混合脂肪酸甘油酯 10 mL, 用含 5% 聚山梨酯 80 中和剂的氯化钠蛋白胨缓冲液(pH 7.0)稀释, 分别制成 1:10 供试液(g / mL, 下同);并取 SFYX - G 供试液(1:10, g / mL)适量, 进一步稀释制成 1:100 供试液, 即得 4 种供试液。

供试液 pH 测定:取上述各供试液适量, 采用 pH 计测定。重复 3 次, 取平均值。结果 SFYX - G(1:10, g / mL) 及感特灵胶囊(1:10, g / mL) 供试液 pH 均低于 6.4(可能影响敏感菌株)。详见表 3。

加菌供试液回收率测定:取 4 种供试液各 9.9 mL, 分别加 0.1 mL 含菌量 $\leq 10^4$ cfu / mL 的金葡菌菌悬液, 作为供试液 1 - 4 组;取含 5% 聚山梨酯 80 的氯化钠

表3 供试液pH测定结果(n=3)

Tab. 3 Results of pH measurement of test solutions (n = 3)

供试液	1	2	3	\bar{X}
SFYX - G 1:10	6.35	6.35	6.34	6.35
SFYX - G 1:100	6.96	6.94	6.91	6.94
感特灵胶囊 1:10	6.12	6.15	6.09	6.12
混合脂肪酸甘油酯 1:10	6.94	6.92	6.95	6.94

蛋白胨缓冲液(pH 7.0) 9.9 mL,加0.1 mL含菌量 $\leq 10^4$ cfu/mL的金葡菌菌悬液,作为中和剂对照;同时取9.9 mL氯化钠蛋白胨缓冲液(pH 7.0),加0.1 mL 0.9%氯化钠蛋白胨缓冲液,作为阴性对照。分别取1 mL,注入培养皿,倾倒入TSA,30~35℃培养3 d,测定金葡菌回收率,重复3次。结果SFYX - G(1:10, g/mL)及感特灵胶囊(1:10, g/mL)供试液在品牌C的2批TSA上回收率均不达标(0~0.28),其余均达标(0.74~1.35)。详见表4。

表4 加菌供试液回收率测定结果(n=3)

Tab. 4 Results of recovery rate measurement of added bacteria test solutions (n = 3)

供试液	序次	TSA			
		A	B	C ₁	C ₂
SFYX - G (1:10, g/mL)	1	0.89	0.92	0	0
	2	1.30	1.32	0	0
	3	1.05	1.09	0	0
	\bar{X}	1.08	1.11	0	0
SFYX - G (1:100, g/mL)	1	1.23	1.18	1.35	1.28
	2	1.03	1.15	1.07	1.12
	3	0.97	1.02	1.05	1.03
	\bar{X}	1.08	1.12	1.16	1.14
感特灵胶囊 (1:10, g/mL)	1	1.03	1.05	0	0
	2	0.92	1.23	0.25	0.28
	3	1.03	0.92	0.11	0.22
	\bar{X}	0.99	1.07	0.12	0.17
混合脂肪酸甘油酯 (1:10, g/mL)	1	1.03	0.82	0.74	0.82
	2	1.15	1.05	1.09	0.93
	3	0.92	1.07	1.05	1.12
	\bar{X}	1.03	0.98	0.96	0.96
中和剂对照	1	1.05	1.03	1.05	1.02
	2	1.00	1.00	1.03	0.97
	3	1.03	0.95	0.93	1.09
	\bar{X}	1.03	0.99	1.00	1.03
阴性对照	1	0	0	0	0
	2	0	0	0	0
	3	0	0	0	0
	\bar{X}	0	0	0	0

3 讨论

本研究中在中药颗粒剂SFYX - G样品微生物限度检查方法转移时,使用了不同品牌TSA,实验室取1:10供试液平皿法试验,金葡菌的回收率可达到1.00左右,而企业金葡菌的回收率几乎为0,明显不符合要求,方法转移失败。实验室分别从供试品性质角度选取了有抑菌性质的相似中药(感特灵胶囊)、化学辅料(混合脂肪酸甘油酯)与SFYX - G样品进行对比试验;检测3个样品供试液pH;使用3个品牌的TSA展开调查分析。结果显示,3个样品均以含5%聚山梨酯80的稀释液制成1:10(g/mL)的供试液消除抑菌性后,化学辅料混合脂肪酸甘油酯(硬脂)使用3个品牌的TSA均能满足药典要求,SFYX - G、感特灵胶囊使用品牌A、B的TSA金葡菌回收率符合药典要求,而使用品牌C的TSA不符合要求。进一步发现,2种中药制剂的共性是1:10的供试液pH均在6.0~6.4(偏酸性),稀释至1:100时pH介于6.9~7.0,此时使用品牌C的TSA进行试验才能满足要求。针对以上现象,从TSA角度分析,可能是3个品牌TSA质量存在一定的差异性,在样品不敏感时,未体现,在样品存在抑菌性时,做加菌回收试验时则会表现出来。从样品角度,中药制剂成分较复杂,自身也存在不同程度的抑菌作用,不仅体现在方剂有效成分对细菌直接抑杀,同时还表现在方剂中各味药多种成分相互作用的综合效应上^[7-8]。

金葡菌营养要求不高,需氧或兼性厌氧,大多数菌株能在6.5~46℃(最适生长温度为37℃)及pH 4.2~9.3(最适pH为7.4)生长^[9],中药制剂低pH(<6.5)的特性可能是造成在品牌C TSA金葡菌回收率低的原因之一。偏酸性中药制剂在微生物限度检查方法开发时,需重点考虑TSA质量。本研究中,品牌C(C₁)pH偏低,2020年版《中国药典(四部)》通则1101无菌检查法^[3]要求灭菌后TSA在25℃的平均pH为7.3±0.2;品牌A和品牌B TSA金葡菌的平均回收率均达标,品牌C的2批TSA虽达标,但也接近标准下限。也有研究发现,品牌C的TSA相比于默克公司和北京三药科技有限公司相应TSA,枯草芽孢杆菌、金葡菌、黑曲霉回收率均为最低,分别为88.2%,67.0%,89.7%^[10]。在特殊的品种中,使用3个品牌的TSA差异较大,《中国药典》对培养基适用性的要求为最基本要求,通过适用性检查的培养基不一定满足特定产品方法的需要。培养基适用性检查时,欧洲药典及美国药典采用“之前验证过的培养基”作为对照培养基,而《中国药典》统一使用中国食品药品检定研究院的对照培养基作为参比来评价培养基的质

量^[11],在《中国药典》未来的修订中与国际人用药品注册技术协调会(ICH)一致时,需考虑国情及培养基质量控制的重要性。

微生物限度检查能直接反映药品的质量,方法适用性试验则能保证检验结果的准确可靠^[12],在方法验证时,一般不会采用不同品牌培养基进行比对,因此,建立好的方法不一定能满足所有品牌培养基的技术要求,应综合考虑培养基的质量与方法的匹配度,避免因培养基质量问题而影响微生物试验结果的准确性和可靠性^[13]。当检验所用到的培养基品牌与验证不同时,需再次对方法进行确认后再使用^[14],培养基在出厂前,虽然已按相关标准要求检验合格。但使用单位在验收时按照《中国药典》标准验收合格,仍会存在微小差异,如培养基的原料或工艺差异,导致pH、澄清度等理化指标和微生物性能的差异,加菌回收的菌落数量和菌落大小的差异^[15-17]。且样品的抑菌性、污染程度不均一、损伤菌的恢复情况随不同TSA培养基而异^[18],人为操作或计数误差等偶然因素也可能会导致检验结果存在差异。各制药企业在选购培养基时,除考察能否满足《中国药典》要求的适用性试验标准,还需考虑培养基是否能真实反映生物负载的情况。在日常的检验检测及国家级、省级抽检中,应充分考虑微生物限度检查的影响因素,或试剂、培养基性质差异,培养条件、使用耗材不同造成的影响^[19]。对于采用已建立的方法更换培养基的,需关注更换培养基供应商可能存在的漏检风险。若更换培养基的品牌,对于低pH且具有一定抑菌活性的样品,提示需评估变更培养基供应商带来的方法转移失败风险,2020年版《中国药典》通则1105中规定“若检验程序或产品发生变化可能影响检验结果时,计数方法应重新进行适用性试验”,提示在培养基品牌发生变化的时候,对于某些特殊品种,培养基品牌变更也可能会影响方法的有效性,因此,应进行适当的确认,避免试验中出现因使用不同品牌的产品所造成的误差^[20],保证检验检测的有效性、药品的安全性。

本研究尚存在以下局限性,所选样品为低pH中药制剂,虽在不同品牌培养基之间微生物限度检查存在偏差,但所得结论仍需纳入更多低pH中药制剂进一步明确,并整理形成该类药品在微生物限度检查方法及检验检测中的专家共识。

综上所述,低pH中药制剂微生物限度检查方法建立时,应注意培养基的选择,一旦方法验证时确定好培养基品牌,在日常的检验检测中应使用相同品牌的培养基,更换培养基品牌需对方法进行确认复核,以避免方法转移失败。

参考文献

- [1] 庞云娟,刘康连,梁晓玲,等. 药品微生物限度检查方法适用性的研究进展[J]. 药物分析杂志,2024,44(8):1285-1292.
- [2] 庞云娟,樊文研,刘康连,等. 药品微生物限度检查方法学验证的研究进展[J]. 中成药,2017,39(10):2137.
- [3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(四部)[M]. 北京:中国医药科技出版社,2020:160-162.
- [4] 武永秀,马仕洪,杨美琴,等. 人参土芽孢杆菌用于胰酪大豆胨琼脂培养基的质量控制研究[J]. 中国药事,2019,33(2):166-171.
- [5] 王凯芬,高月. 不同品牌结晶紫中性红胆盐琼脂培养基的质量比较[J]. 中国科技期刊数据库科研,2016(12):164-165.
- [6] 李琼琼. 金黄色葡萄球菌菌膜形成影响因素研究[D]. 上海:上海交通大学,2011.
- [7] 刘云宁,李小凤,班旭霞,等. 中药抗菌成分及其抗菌机制的研究进展[J]. 环球中医药,2015,8(8):1012-1017.
- [8] 杨群,肖文涛. 两种中药酊剂微生物限度方法适用性研究[J]. 药物研究,2020,17(17):30-32.
- [9] 张丹. 食品微生物检验中培养基质量控制策略[J]. 食品安全导刊,2024(13):25-27.
- [10] 李天翥,龚翠. 按照《中国药典》2015版对不同厂商检验用培养基筛选的考察与研究[J]. 系统医学,2016,1(9):131-137.
- [11] 马仕洪,杨美琴,刘鹏. 《中国药典》2010年版对照培养基的研制与应用[J]. 中国药事,2012,26(8):847-851.
- [12] 刘佳,杨跃辉. 赤丹丸微生物限度检查方法适用性研究[J]. 海峡药学,2024,36(7):44-47.
- [13] 梁谋,庞逸辉,刘欢,等. 胰酪大豆胨琼脂培养基比对研究[J]. 中国医药科学,2024,14(5):73-80.
- [14] 戴宇婷,赵晓星,张金玺. 药品检验用计数培养基配制、灭菌及贮藏研究[J]. 中国卫生标准管理,2020,11(1):94-97.
- [15] 朱斌,刘涛,蒋受军,等. 不同品牌药品微生物限度检查用计数培养基的质量比较[J]. 中国药房,2010,21(25):2365-2368.
- [16] 解慧,路立京,曹晓云. 市售《中国药典》2015年版非无菌产品微生物限度检查用培养基质量评价[J]. 天津药学,2016,28(5):18-22.
- [17] 杜宗绪. 3种平板计数琼脂培养基的质量比较[J]. 山西农业科学,2014,42(8):835-837.
- [18] 任河山,李景云,王跃凤,等. 铜绿假单胞菌定量冷冻干燥菌球与新鲜制备菌悬液用于胰酪大豆胨琼脂培养基适用性检查的研究[J]. 中国药事,2022,36(12):1397-1402.
- [19] 张小莉. 药品微生物限度检查方法适用性资料问题分析[J]. 中国药业,2019,28(8):79-81.
- [20] 肖杨,贺征,罗健梅. 4种测定化妆品菌落总数培养基的质量比较[J]. 现代预防医学,2007,34(24):4722-4723.

(收稿日期:2025-02-12;修回日期:2025-09-13)