

# 复方三七丸微生物限度检查法的建立

熊俐 李再新\*, 王莉, 徐宴军, 曹新志 (四川理工学院生物工程学院, 四川自贡 643000)

**摘要** [目的] 为复方三七丸建立合适的微生物限度检查方法。[方法] 用常规法、培养基稀释法、离心沉淀法和薄膜过滤法检测复方三七丸对细菌、酵母菌和霉菌的回收率。[结果] 常规检验发现白色念珠菌和黑曲霉的回收率都在70%以上;培养基稀释法检测到金黄色葡萄球菌试验组的回收率在70%以上;离心沉淀法+培养基稀释法检测出大肠埃希氏菌的回收率为84%;离心沉淀法+薄膜过滤法检测出枯草芽孢杆菌的回收率为87%。此外,大肠埃希氏菌、大肠菌群和沙门菌3种控制菌在常规法检测中都表现出专一性。[结论] 复方三七丸的微生物限度检查法确立为:酵母菌和霉菌的检测采用常规法;革兰氏阳性菌的检测采用培养基稀释法;革兰氏阴性菌的检测采用离心沉淀法+培养基稀释法;枯草芽孢杆菌检测采用离心沉淀法+薄膜过滤法。控制菌采用常规法即可正确检出。

**关键词** 复方三七丸;微生物限度检查;回收率

中图分类号 S182 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2009)09-03874-03

## Establishing a Method for Microbial Limit Tests of Compound Prescription Pill Sanqi

XIONG Li et al (Department of Biological Engineering, Sichuan University of Science and Engineering, Zigong, Sichuan 643000)

**Abstract** [Objective] The research was to provide a method of the microbial limit tests of compound prescription pill Sanqi. [Method] The recovery rate of bacteria, yeast and moulds was detected by routine examination methods and those methods with medium dilution, centrifugal sedimentation, centrifugal sedimentation and membrane filtration. [Result] It was validated that it was appropriate for yeast and mould to be detected by routine examination methods, in which the recovery rates of *Candida albicans* and *Aspergillus niger* were 83% and 85%, respectively. It was appropriate for gram positive bacteria to be detected by the methods with culture medium dilution, in which the recovery rate of *Staphylococcus aureus* was over 70%. It was appropriate for gram negative bacteria to be detected by the methods with centrifugal sedimentation and culture medium dilution, in which the recovery rate of *Escherichia coli* was 84%. And it was appropriate for *Bacillus* sp. to be detected by the methods with centrifugal sedimentation and membrane filtration, in which the recovery rate was 87%. It was also found that routine examination method was appropriate to be used for the controlled strains, *Escherichia coli*, coliform and *Salmonella*.

**Key words** Compound prescription pill Sanqi; Microbial limit test; Recovery rate

复方三七丸是一种中成药,具有一定的抑菌作用,对其进行微生物限度检测时,应先降低或消除其抑菌作用,才能反映药品的真实污染情况。试验采用常规法、培养基稀释法、离心沉淀法和薄膜过滤法等方法来测定复方三七丸对大肠埃希氏菌(代表革兰氏阴性菌)、金黄色葡萄球菌(代表革兰氏阳性菌)、白色念珠菌(代表酵母菌)、黑曲霉(代表霉菌)和枯草芽孢杆菌(代表药品中常见的污染菌)等菌株的回收率,并验证了大肠埃希氏菌、大肠菌群和沙门菌等控制菌的检查方法,以期为复方三七丸的微生物限度检测提供依据。

### 1 材料与方

**1.1 供试样品** 复方三七丸(成都永康制药有限公司,批号:080301)。

**1.2 验证菌种** 大肠埃希氏菌[CMCC(B)44102]、金黄色葡萄球菌[CMCC(B)26003]、枯草芽孢杆菌[CMCC(B)63501]、白色念珠菌[CMCC(F)98001]、黑曲霉[CMCC(F)98003]、乙型副伤寒沙门菌[CMCC(B)50094]菌种,均从四川省药品检验所购买。

**1.3 稀释液** 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液(pH值7.0)。

**1.4 培养基** 虎红琼脂培养基,改良马丁培养基,胆盐硫乳琼脂培养基,营养肉汤培养基,胆盐乳糖培养基,胆盐乳糖发酵培养基,MUG培养基,麦康凯琼脂培养基,三糖铁琼脂培养基,赖氨酸脱羧酶培养基,脱羧酶试验对照培养基,尿素琼脂培养基,氰化钾培养基和氰化钾对照培养基。

**1.5 试验仪器** 电热压力蒸汽灭菌锅,离心机,KXB250A0生化培养箱,电热恒温箱,无菌检查薄膜过滤器等。

**1.6 供试液的制备** 取供试品10g置研钵中,加入少量无

菌氯化钠-蛋白胨缓冲液研碎,再加入缓冲液制成1:10的供试液备用。

**1.7 菌液制备** 分别接种大肠埃希氏菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌和沙门菌至营养肉汤培养基中,于30~35℃下培养24h;接种白色念珠菌至改良马丁培养基中,于23~28℃下培养48h。然后各取以上培养液1ml用无菌氯化钠溶液稀释,分别取1ml $10^{-5}$ 、 $10^{-6}$ 和 $10^{-7}$ 稀释液至平皿中,倾注营养琼脂培养基,培养48h,计数;接种黑曲霉菌至改良马丁琼脂斜面培养基中,于23~28℃下培养7d,加入5ml无菌氯化钠溶液将孢子洗脱,取孢子悬液1ml,用无菌氯化钠溶液稀释,分别取1ml $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$ 、 $10^{-6}$ 稀释液至平皿中,倾注虎红琼脂培养基,培养48h,计数。选取菌落数为50~100个的相应稀释级的培养液,保存备用。

### 1.8 回收率测定

**1.8.1 常规法测定**<sup>[1]</sup>。试验组:分别将1ml供试液和菌液同时注入平皿中,倾注营养琼脂培养基,于30~35℃下培养48h,观察计数;白色念珠菌和黑曲霉改用虎红琼脂培养基,于23~28℃下培养72h,观察计数。菌液组:在平皿中加入1ml菌液,培养检测方法同试验组。供试品对照组:不加菌液,按试验组方法测定供试品菌数。稀释剂对照组:取无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液50ml,过滤,将滤膜正贴于营养琼脂平皿上培养检测。

**1.8.2 培养基稀释法测定**<sup>[2]</sup>。取供试液制备成浓度0.5、0.2和0.1ml/皿,每平皿加入试验菌,然后进行培养检测。

**1.8.3 离心沉淀法+培养基稀释法测定**。取供试液10ml离心,弃去上清液留底层约1~2ml的沉淀,加缓冲液至10ml作为供试液,取其制备成浓度0.5、0.2、0.1ml/皿,然后注入培养基培养,检测、计数。

**1.8.4 离心沉淀法+薄膜过滤法**<sup>[3]</sup>测定。取离心沉淀后制

基金项目 四川理工学院项目资助。

作者简介 熊俐(1976-),女,四川自贡人,助理实验师,从事生物工程研究。\*通讯作者。

收稿日期 2009-01-12

备的供试液10 ml,加冲洗液50 ml混匀,过滤,再以冲洗液洗3次。在最后一次冲洗液中加入1 ml含50~100 cfu的菌液,混匀,过滤。再将滤膜正贴于营养琼脂平皿上培养、检测。

**1.9 控制菌检查法的验证** 口服给药制剂,控制菌应检查大肠埃希氏菌、大肠菌群及沙门菌<sup>[4]</sup>。在对大肠埃希氏菌的检查中利用MUG培养基培养及靛基质试验来对其进行检测。对大肠菌群的检测利用胆盐乳糖发酵法,并用麦康凯琼脂培养基分离培养。利用三糖铁琼脂培养基、赖氨酸脱羧酶培养基、脱羧酶试验对照培养基、尿素琼脂培养基、氰化钾培养基、氰化钾对照培养基对沙门菌进行检验,并利用半固体营养琼脂进行穿刺培养,观察其动力性。

## 2 结果与分析

### 2.1 回收率的测定

**2.1.1 常规法。**由表1可见,在常规法检验中,白色念珠菌及黑曲霉的回收率都在70%以上,说明此法适宜于复方三七丸对酵母菌和霉菌的限度检测。而大肠埃希氏菌、枯草芽孢杆菌和金黄色葡萄球菌回收率都低于75%,表明复方三七丸对它们有不同程度的抑制作用。稀释剂对照组的回收率均大于70%,说明氯化钠-蛋白胨缓冲液对试验不产生干扰。

表1 常规法测定的回收率

菌种	供试品组	试验组	稀释剂对照组
Strains	Test samples group	Trial group	Thinner control group
大肠埃希氏菌	0	9.8	91.5
Escherichia coli			
金黄色葡萄球菌	0	65.0	92.6
Staphylococcus aureus			
枯草芽孢杆菌	0	0	83.9
Bacillus sp.			
白色念珠菌	0	83.0	92.6
Candida albican			
黑曲霉	0	85.0	92.4
Aspergillus niger			

**2.1.2 培养基稀释法。**由表2可以看出当培养皿中注入0.5 ml的供试液时,金黄色葡萄球菌试验组的回收率在70%以上,说明培养基稀释法适宜于复方三七丸对金黄色葡萄球菌的限度检测。但当每平皿注入0.1 ml供试液时,大肠埃希氏菌试验组回收率低于70%,而枯草芽孢杆菌试验组回收率仅为15%,说明培养基稀释法不能完全消除复方三七丸的抑菌作用。

表2 培养基稀释法测定的试验组回收率

供试品量	大肠埃希氏菌	枯草芽孢杆菌	金黄色葡萄球菌
Test samples volume	Escherichia coli	Bacillus sp.	Staphylococcus aureus
0.5 ml/平皿0.5 ml/皿	21	5	78
0.2 ml/平皿0.2 ml/皿	39	10	
0.1 ml/平皿0.1 ml/皿	63	15	

**2.1.3 离心沉淀法+培养基稀释法。**由表3可以看出当供试液的量为0.5 ml/皿时,即可使大肠埃希氏菌的试验组回收率达到70%,表明离心沉淀法+培养基稀释法适宜于复方三

七丸对大肠埃希氏菌的限度检测。而当供试液的量为0.1 ml/皿时,枯草芽孢杆菌试验组回收率也只有63%,说明该法只可部分消除复方三七丸的抑菌作用。

表3 离心沉淀法+培养基稀释法测定的试验组回收率

供试液量	大肠埃希氏菌	枯草芽孢杆菌
Test samples volume	Escherichia coli	Bacillus sp.
0.5 ml/皿0.5 ml/皿	84	26
0.2 ml/皿0.2 ml/皿		47
0.1 ml/皿0.1 ml/皿		63

**2.1.4 离心沉淀法+薄膜过滤法。**将离心沉淀法与薄膜过滤法结合对供试液进行处理后,枯草芽孢杆菌的回收率达到70%以上,说明该法适宜于复方三七丸对枯草芽孢杆菌的限度检测。

### 2.2 控制菌检查方法的验证

**2.2.1 大肠埃希氏菌检查方法的验证。**利用MUG培养和靛基质试验对大肠埃希氏菌进行培养检测。阴性菌对照组中加入的是金黄色葡萄球菌,其目的是为了验证该反应对大肠埃希氏菌的专一性。表4显示试验组在MUG培养基培养检测及靛基质试验中均呈阳性,说明其中含有大肠埃希氏菌。阴性菌对照的反应呈阴性,说明该反应对大肠埃希氏菌具有专一性。

表4 大肠埃希氏菌的检测

试验对象	生化特性	
	MUG培养基培养	靛基质试验
Test objects	MUG medium cultivation	Indole formation trial
试验组 Trial group	+	+
阴性菌对照组	-	-
Negative strains control group		
阴性对照组	-	-
Negative control group		
供试品组	-	-
Test samples group		

注:“+”表示阳性;“-”表示阴性。下同。

Note: + stands for positive; - stands for negative. The same as below.

**2.2.2 大肠菌群检查方法的验证。**利用胆盐乳糖发酵培养、麦康凯琼脂分离培养和乳糖发酵培养对大肠菌群进行检测,阴性菌对照组中加入的是金黄色葡萄球菌。从表5中可以看出,在胆盐乳糖发酵培养中,只有试验组产酸产气,这可以排除对照组中含有大肠菌群。继续对试验组进行分离培养及乳糖发酵,出现发酵乳糖及产酸产气现象,判定试验组确实含有大肠菌群。阴性菌对照的反应呈阴性,说明该反应对大肠菌群具有专一性。

**2.2.3 沙门菌检查方法的验证。**利用胆盐硫乳琼脂培养基、麦康凯琼脂培养基培养、三糖铁试验及动力检查等方法,来检验沙门菌。由表6可知,在分离培养中,只有试验组平板出现疑似沙门菌菌落,对试验组进行生化试验、赖氨酸脱羧酶试验及动力检查,结果均表现为阳性,判定含有沙门菌。而阴性菌对照组未出现与试验组相同的反应,说明该反应对

沙门菌具有专一性。

表5 大肠菌群的检测

Table 5 The detection of coliform bacteria

试验对象 Test objects	生化特性 Biochemical characteristics		
	胆盐乳糖发酵管 Lactose bile fermentation tube	麦康凯琼脂 MacConkey agar medium	乳糖发酵管 Lactose fermenta- tion tube
试验组 Trial group	+	+	+
阴性菌对照组 Negative strains control group	-	-	-
供试品组 Test samples group	-	-	-
阴性对照组 Negative control group	-	-	-

### 3 结论与讨论

采用常规法测定时,大肠埃希氏菌、金黄色葡萄球菌和枯草芽孢杆菌的回收率均小于70%,而白色念珠菌和黑曲霉的回收率都在80%以上,说明常规法只适于复方三七丸对酵母菌及霉菌的限度测定。试验结果还表明复方三七丸对大肠埃希氏菌、金黄色葡萄球菌和枯草芽孢杆菌有较强的抑制作用,但作用机理尚不明确,有待于进一步研究。采用培养基稀释法测定时,金黄色葡萄球菌的回收率达78%,说明它适于革兰氏阳性菌的限度检测。利用离心沉淀法+培养基稀释法测定时,大肠埃希氏菌的回收率达84%,说明它适于革兰氏阴性菌的限度检测。采用离心沉淀法+薄膜过滤法测定时,枯草芽孢杆菌的回收率达87%,说明它适于该菌的限度检测。

表6 沙门菌的检测

Table 6 The detection of Salmonella

试验条件 Trial conditions	试验组 Trial group	阴性菌对照 Negative strains control group	供试品组 Test samples group	阴性对照 Negative control group
麦康凯琼脂培养 MacConkey agar medium	+	-	-	-
三糖铁试验 Triple sugar iron trial	+	-	-	-
靛基质试验 Indole formation trial	+	-	-	-
脲酶试验 Urease trial	+	-	-	-
氰化钾试验 Potassium cyanide trial	+	-	-	-
赖氨酸脱羧酶试验 Lysine decarboxylase trial	+	-	-	-
动力检查 Dynamical detection	+	-	-	-

### 参考文献

- [1] 宋勤,袁林娜,刘应旭.口服头孢拉定制剂微生物限度检查法研究试验[J].药物分析杂志,2005,25(6):689-691.  
[2] 黄小静.4种丸剂微生物限度检查法方法验证[J].海峡药学,2008,20

(6):75-77.

- [3] 刘咏梅,邵囊.西吡氯铵含漱液微生物限度检查方法的研究[J].中国药业,2000,9(10):22.  
[4] 国家药典委员会.中华人民共和国药典二部[M].北京:化学工业出版社,2000:附录92.

(上接第3866页)

际问题的优势,可从一定程度上提高土壤含水量的检测精

度。实践证明该方法操作简便、实时性好且不破坏土壤环境。因此,该方法在土壤含水量检测中将得到广泛应用。

表3 贝叶斯LS SVM模型检测值及其与实测值的相对误差

Table 3 The relative error between the test value by Bayes LS SVM model and the measured value

样本序号 No. of samples	土壤含水量实测值 Measured value of water content in soil	贝叶斯LS SVM模型检测值 Test value by Bayes LS SVM model	相对误差 Relative error	样本序号 No. of samples	土壤含水量实测值 Measured value of water content in soil	贝叶斯LS SVM模型检测值 Test value by Bayes LS SVM model	相对误差 Relative error
1	32.85	32.50	1.07	11	23.31	23.32	0.04
2	32.18	32.42	0.75	12	22.73	23.26	2.33
3	28.63	28.45	0.63	13	22.16	22.30	0.63
4	28.12	27.99	0.46	14	22.04	22.14	0.45
5	27.88	28.32	1.58	15	21.72	21.34	1.75
6	25.86	26.05	0.73	16	21.54	21.03	2.37
7	25.43	25.59	0.63	17	20.38	21.03	3.19
8	24.75	24.51	0.97	18	17.75	17.91	0.90
9	24.68	24.17	2.07	19	14.39	14.25	0.97
10	24.21	23.96	1.03	20	12.35	12.43	0.65

### 参考文献

- [1] 刘中合,王瑞雪,王锋德,等.数字图像处理技术现状与展望[J].计算机时代,2005(9):6-8.  
[2] 刘永岗,王曰鑫,李学哲.气量法快速测定土壤含水量技术[J].水土保持科技情报,2005(6):25-27.  
[3] 时新玲,王国栋.土壤含水量测定方法研究进展[J].中国农村水利水

电,2003(10):84-86.

- [4] VAN G T, SUYKENS J A K, BAESTAENS D K, et al. Financial time series prediction using least squares support vector machines within the evidence framework[J]. IEEE Transactions on Neural Networks, 2001, 12(4):809-821.  
[5] 张学工.关于统计学习理论与支持向量机[J].自动化学报,2000,26(1):32-42.