

## · 中药工业 ·

## 血塞通分散片与七叶神安片微生物限度检查方法研究

牛振东<sup>1,2,3\*</sup>, 陈卓<sup>1,2,3</sup>, 郝运伟<sup>1,2,3</sup>

1. 北京市药品检验研究院 国家药品监督管理局创新药物安全研究与评价重点实验室, 北京 102206;

2. 北京市药品检验研究院 国家药品监督管理局中成药质量评价重点实验室, 北京 102206;

3. 北京市药品检验研究院 中药成分分析与生物评价北京重点实验室, 北京 102206

**[摘要]** **目的:** 建立血塞通分散片、七叶神安片的微生物限度检查方法并进行验证和评价。**方法:** 根据《中华人民共和国药典》(以下简称《中国药典》) 2020年版(四部)通则1105、1106和1107的要求, 分别采用常规平皿法、稀释法、稀释法和添加中和剂法联用对2个不同厂家的血塞通分散片、七叶神安片进行方法适用性试验。**结果:** 采用稀释法和添加中和剂法联用可以消除血塞通分散片和七叶神安片对需氧菌的抑菌性, 霉菌和酵母菌总数计数及控制菌检查采用常规法即可满足《中国药典》2020年版要求。**结论:** 所建立的方法稳定、准确, 利用稀释法和添加中和剂法联用能有效去除抑菌成分, 不影响污染微生物的生长, 适用于血塞通分散片与七叶神安片的微生物限度检查。

**[关键词]** 血塞通分散片; 七叶神安片; 微生物限度检查; 方法适用性**[中图分类号]** R286 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1673-4890(2025)06-1143-05**doi:** 10.13313/j.issn.1673-4890.20240827001

## Microbial Limit Testing Method of Xuesaitong Dispersion Tablets and Qiye Shen'an Tablets

NIU Zhendong<sup>1,2,3\*</sup>, CHEN Zhuo<sup>1,2,3</sup>, HAO Yunwei<sup>1,2,3</sup>

1. NMPA Key Laboratory for Safety Research and Evaluation of Innovative Drugs, Beijing Institute for Drug Control, Beijing 102206, China;

2. NMPA Key Laboratory for Quality Evaluation of Traditional Chinese Medicine, Beijing Institute for Drug Control, Beijing 102206, China;

3. Beijing Key Laboratory of Analysis and Evaluation on Chinese Medicine, Beijing Institute for Drug Control, Beijing 102206, China

**[Abstract]** **Objective:** To establish microbial limit testing methods for Xuesaitong Dispersion Tablets and Qiye Shen'an Tablets and verify and evaluate these methods. **Methods:** Following General Chapters 1105, 1106, and 1107 of the fourth volume of *Pharmacopoeia of the People's Republic of China* (hereinafter referred to as *Chinese Pharmacopoeia*) (2020 edition), conventional plate method, dilution method, and combined dilution method and neutralizer addition method were used to test the applicability of Xuesaitong Dispersion Tablets and Qiye Shen'an Tablets from two different manufacturers. **Results:** The antibacterial activity of Xuesaitong Dispersion Tablets and Qiye Shen'an Tablets against aerobic bacteria was eliminated by the combined dilution method and neutralizer addition method. The total count of mold and yeast and the examination of control bacteria met the requirements of *Chinese Pharmacopoeia* (2020 edition) by conventional methods. **Conclusion:** The method established in this study is stable and accurate, and the combined dilution method and neutralizer addition method can effectively remove antibacterial components, without affecting the growth of contaminating microorganisms. This method is suitable for the microbial limit testing of Xuesaitong Dispersion Tablets and Qiye Shen'an Tablets.

**[Keywords]** Xuesaitong Dispersion Tablet; Qiye Shen'an Tablet; microbial limit testing; applicability of method

\* [通信作者] 牛振东, 副主任药师, 研究方向: 药品、化妆品、保健食品微生物检验; E-mail: dividniu@163.com

中成药是以中药饮片为原材料,加工制作成各类制剂的中药制品。在中成药生产和运输等过程中可能会出现微生物污染,《中华人民共和国药典》(以下简称《中国药典》)2020年版(四部)通则1107<sup>[1]</sup>规定了非无菌中药制剂、含药材原粉的中药制剂的微生物限度标准,因此有必要对中成药进行微生物限度检查研究。此外,《中国药典》2020年版(四部)通则1105、1106<sup>[1]</sup>规定了方法适用性试验的要求,对具有抑菌作用的中成药,需采用稀释法和添加中和剂等不同方法消除其抑菌性,建立适用于各种中成药制剂的微生物限度检查方法。

三七是一种名贵的中药材,具有活血化瘀、消肿止痛等功效<sup>[2]</sup>。三七根是提取皂苷类成分的重要部位,具有扩张冠状动脉、增加冠状动脉血流量和改善心肌功能等功效,是心绞痛和冠心病患者的良药<sup>[3]</sup>;从三七根和茎中提取三七总皂苷,加适量辅料,制成血塞通分散片、颗粒或胶囊等中成药<sup>[4]</sup>。三七叶富含的皂苷成分具有镇静安神和抗衰老的作用,提取三七叶总皂苷,制成七叶神安片、胶囊或滴丸等安眠镇静药物<sup>[5-8]</sup>。

《中国药典》2020年版(一部)收录的血塞通分散片和七叶神安片处方的主要有效成分分别是三七总皂苷和三七叶总皂苷,其皂苷成分提取自三七的不同部位,功效也略有不同<sup>[2]</sup>。《中国药典》2020年版(四部)片剂通则0101<sup>[1]</sup>规定,片剂在生产和贮存期间微生物限度应符合要求。但目前尚未报道关于血塞通分散片和七叶神安片各种剂型中成药的微生物限度检查方法的适用性,迫切需要建立科学、有效的适用于血塞通分散片和七叶神安片的微生物限度的检查方法,保障药品的质量控制,亦为血塞通和七叶神安其他剂型的微生物限度检查方法提供参考。

总皂苷的主要成分为人参皂苷Rb<sub>1</sub>、人参皂苷Rb<sub>2</sub>、人参皂苷Rc和人参皂苷Rb<sub>3</sub>等<sup>[9-10]</sup>,具有抗炎作用和一定的抑菌性,需选择适当的方法消除皂苷的抑菌性后再进行微生物限度检查。本研究按照《中国药典》2020年版(四部)通则1105、1106<sup>[1]</sup>中要求的微生物限度检查方法(微生物计数法、控制菌检查法)对血塞通分散片和七叶神安片进行方法适用性试验,旨在为类似含有抑菌成分药品相关的微生物限度检查提供参考。

## 1 材料

### 1.1 样品

血塞通分散片和七叶神安片均分别来自2个不同的厂家,具体信息见表1。

表1 血塞通分散片和七叶神安片信息

| 名称     | 样品编号 | 规格      | 批号      | 厂家            |
|--------|------|---------|---------|---------------|
| 血塞通分散片 | A    | 50 mg/片 | 211201  | 黑龙江葵花药业集团有限公司 |
|        | B    | 50 mg/片 | 211202  | 海南海力制药有限公司    |
| 七叶神安片  | C    | 50 mg/片 | 2201001 | 湖北李时珍医药集团有限公司 |
|        | D    | 50 mg/片 | 220510  | 云南特安呐制药股份有限公司 |

### 1.2 试药

胰酪大豆胨液体培养基(TSB,批号:20240226)、麦康凯液体培养基(批号:20240304)、麦康凯琼脂培养基(批号:20221208)、pH 7.0氯化钠-蛋白胨缓冲液(批号:20240106)、pH 7.0含3%聚山梨酯-80和0.3%卵磷脂的氯化钠-蛋白胨缓冲液(批号:20240106)均购自北京奥博星生物技术有限公司;胰酪大豆胨琼脂培养基(TSA,批号:2129243)、沙氏葡萄糖琼脂培养基(SDA,批号:2066085)均购自美国BD公司。

金黄色葡萄球菌[CMCC(B)26003]、铜绿假单胞菌[CMCC(B)10104]、枯草芽孢杆菌[CMCC(B)63501]、白色念珠菌[CMCC(F)98001]、黑曲霉[CMCC(F)98003]和大肠埃希菌[CMCC(B)44102]均购自中国食品药品检定研究院,试验用菌株均为第3代。

### 1.3 仪器

1300 SERIES A2型生物安全柜(美国Thermo Fisher Scientific公司);LRH-250F型生化培养箱(上海一恒科学仪器有限公司);BIST-A-D型电热脉动真空灭菌器(山东新华医疗器械股份有限公司);ML1602型电子天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司]。

## 2 方法

### 2.1 菌液的制备

按照《中国药典》2020年版(四部)1105<sup>[1]</sup>要求,将金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、枯草芽孢杆菌、大肠埃希菌、白色念珠菌和黑曲霉进行培养,分别配制

成浓度 $\leq 100 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的菌悬液。

## 2.2 供试品溶液的制备

**2.2.1 不含中和剂的供试品溶液的制备** 取样品10 g置于无菌均质袋中,加无菌的pH 7.0氯化钠-蛋白胨缓冲液溶解至100 mL,振摇至样品分散均匀,制成质量浓度为 $100 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的供试品储备液。取供试品储备液10 mL置于无菌均质袋中,加无菌的pH 7.0氯化钠-蛋白胨缓冲液90 mL,制成质量浓度为 $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的供试品溶液。

**2.2.2 含中和剂的供试品溶液的制备** 取样品10 g置于无菌均质袋中,加无菌的pH 7.0含3%聚山梨酯-80和0.3%卵磷脂的氯化钠-蛋白胨缓冲液溶解至100 mL,振摇至样品分散均匀,制成质量浓度为 $100 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 含中和剂的供试品储备液。取供试品储备液10 mL置于无菌均质袋中,加无菌的pH 7.0含3%聚山梨酯-80和0.3%卵磷脂的氯化钠-蛋白胨缓冲液90 mL,制成质量浓度为 $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 含中和剂的供试品溶液。

## 2.3 计数方法适用性试验

**2.3.1 常规平皿法** 取2.2.1项下供试品储备液10 mL置于无菌试管中,加入2.1项下菌液0.1 mL,混匀,即得试验组溶液;取2.2.1项下供试品储备液10 mL置于无菌试管中,加入无菌的pH 7.0氯化钠-蛋白胨缓冲液0.1 mL,混匀,即得对照组溶液;取无菌的pH 7.0氯化钠-蛋白胨缓冲液10 mL置于无菌试管中,加入2.1项下菌液0.1 mL,混匀,即得菌液组溶液。上述溶液平行制备2份,取1 mL分别加入融化好的培养基(测定需氧菌菌落回收比值时使用TSA,测定霉菌和酵母菌菌落回收比值时使用SDA),混匀,凝固,测定平均菌落数。

**2.3.2 稀释法** 取2.2.1项下供试品溶液,按2.3.1项下方法测定平均菌落数。

**2.3.3 添加中和剂和稀释法联用** 分别取2.2.2项下供试品储备液、供试品溶液各10 mL置于无菌试管中,分别加入2.1项下菌液0.1 mL,混匀,即得试验组溶液;分别取2.2.2项下供试品储备液、供试品溶液各10 mL置于无菌试管中,分别加入无菌的pH 7.0含3%聚山梨酯-80和0.3%卵磷脂的氯化钠-蛋白胨缓冲液0.1 mL,混匀,即得对照组溶液。除试验组溶液和对照组溶液制备不同外,其余操作均按2.3.1项下方法。

**2.3.4 回收比值的计算** 按公式(1)计算回收比值。其中,添加中和剂和稀释法联用时,计算回收比值以相同样品含量的试验组和对照组平均菌落数进行差值计算。

回收比值=

$$\frac{\text{试验组平均菌落数} - \text{对照组平均菌落数}}{\text{菌液组平均菌落数}} \quad (1)$$

## 2.4 大肠埃希菌适用性检查

根据处方工艺分析,血塞通分散片和七叶神安片属于不含药材原粉的非无菌口服固体制剂,因此按照《中国药典》2020年版(四部)通则1107<sup>[1]</sup>的要求,控制菌检查项为大肠埃希菌。分别取TSB 100 mL,分别加入2.2项下不含中和剂的供试品储备液、含中和剂的供试品储备液10 mL,混匀,于培养箱中33℃培养18~24 h,即得试验组溶液;分别取TSB 100 mL,分别加入2.2项下无菌的pH 7.0氯化钠-蛋白胨缓冲液、pH 7.0含3%聚山梨酯-80和0.3%卵磷脂的氯化钠-蛋白胨缓冲液10 mL,混匀,于培养箱中33℃培养18~24 h,即得阴性对照组溶液;分别取TSB 100 mL,分别加入2.2项下不含中和剂的供试品储备液、含中和剂的供试品储备液10 mL,分别加入浓度 $\leq 100 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的大肠埃希菌1 mL,混匀,于培养箱中33℃培养18~24 h,即得阳性对照组溶液。分别取麦康凯液体培养基100 mL,分别取上述溶液1 mL接种于麦康凯液体培养基,于培养箱中42℃培养24~48 h;用接种环分别取上述溶液划线接种于麦康凯琼脂培养基,于培养箱中33℃培养18~72 h。按《中国药典》2020年版(四部)通则1106<sup>[1]</sup>要求通过常规增菌培养法进行大肠埃希菌检查。

## 3 结果

### 3.1 常规平皿法测定结果分析

根据《中国药典》2020年版(四部)通则1105<sup>[1]</sup>,回收比值为0.5~2.0符合要求。常规平皿法测定结果见表2。金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、白色念珠菌、黑曲霉的回收比值满足规定,枯草芽孢杆菌回收比值 $< 0.50$ ,说明2种药品对枯草芽孢杆菌均具有抑菌性,表明常规平皿法不适用于需氧菌总数计数。此外,霉菌和酵母菌回收比值满足规定。

表2 常规平皿法测定菌落回收比值的结果

| 样品编号 | 需氧菌     |        |        |      |       | 霉菌和酵母菌 |       |
|------|---------|--------|--------|------|-------|--------|-------|
|      | 金黄色葡萄球菌 | 枯草芽孢杆菌 | 铜绿假单胞菌 | 黑曲霉  | 白色念珠菌 | 黑曲霉    | 白色念珠菌 |
| A    | 0.78    | 0.47   | 1.03   | 0.69 | 0.77  | 0.81   | 1.17  |
| B    | 0.76    | 0.45   | 0.95   | 0.66 | 0.78  | 0.87   | 0.90  |
| C    | 0.65    | 0.09   | 1.27   | 0.96 | 0.83  | 0.86   | 0.89  |
| D    | 0.65    | 0.09   | 1.27   | 0.96 | 0.83  | 0.86   | 0.89  |

### 3.2 稀释法测定结果分析

稀释法测定结果见表3。金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、白色念珠菌、黑曲霉的回收比值满足规定，但样品A、C、D的枯草芽孢杆菌回收比值<0.50，均对枯草芽孢杆菌产生抑菌性。说明稀释法不适用于对血塞通分散片和七叶神安片需氧菌总数计数。

表3 稀释法测定需氧菌菌落回收比值的结果

| 样品编号 | 金黄色葡萄球菌 | 枯草芽孢杆菌 | 铜绿假单胞菌 | 黑曲霉  | 白色念珠菌 |
|------|---------|--------|--------|------|-------|
| A    | 0.85    | 0.40   | 1.19   | 0.77 | 0.89  |
| B    | 1.21    | 0.81   | 1.15   | 0.91 | 1.04  |
| C    | 0.88    | 0.35   | 1.00   | 0.99 | 1.00  |
| D    | 0.90    | 0.20   | 0.98   | 0.98 | 1.02  |

### 3.3 稀释法和添加中和剂法联用测定结果分析

稀释法和添加中和剂法联用测定结果见表4。添加中和剂后，血塞通分散片对金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、枯草芽孢杆菌、白色念珠菌和黑曲霉的回收比值满足规定；当血塞通分散片以1:10稀释级稀释时，样品A和B中枯草芽孢杆菌的回收比值分别为0.52、0.82，虽满足《中国药典》2020年版要求，但为了方法的普适性和稳定性，建议将血塞通分散片以1:100稀释级稀释后再进行测定。

表4 稀释法和添加中和剂法联用测定菌落回收比值的结果

| 样品编号 | 稀释级   | 需氧菌     |        |        |      |       | 霉菌和酵母菌 |       |
|------|-------|---------|--------|--------|------|-------|--------|-------|
|      |       | 金黄色葡萄球菌 | 枯草芽孢杆菌 | 铜绿假单胞菌 | 黑曲霉  | 白色念珠菌 | 黑曲霉    | 白色念珠菌 |
| A    | 1:10  | 0.70    | 0.52   | 0.98   | 1.02 | 0.80  | 1.11   | 1.03  |
|      | 1:100 | 0.95    | 0.81   | 0.99   | 0.94 | 0.85  |        |       |
| B    | 1:10  | 0.79    | 0.82   | 1.20   | 1.04 | 1.50  | 0.89   | 1.34  |
|      | 1:100 | 0.92    | 0.80   | 1.28   | 1.09 | 1.02  |        |       |
| C    | 1:10  | 0.99    | 0.25   | 1.11   | 0.99 | 1.02  | 0.99   | 1.00  |
|      | 1:100 | 0.98    | 0.88   | 0.99   | 0.98 | 0.98  |        |       |
| D    | 1:10  | 0.89    | 0.43   | 0.98   | 0.89 | 1.02  | 0.98   | 0.99  |
|      | 1:100 | 1.00    | 0.80   | 1.01   | 1.00 | 1.11  |        |       |

添加中和剂后，七叶神安片对金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、枯草芽孢杆菌、白色念珠菌和黑曲霉的回收比值满足规定；当七叶神安片以1:100稀释级稀释时，枯草芽孢杆菌的回收比值满足规定，故该方法适用于七叶神安片的需氧菌总数计数。

《中国药典》2020年版（四部）通则1105<sup>[1]</sup>规定，如果方法适用性试验符合要求，应采用更高稀释级的供试液进行计数方法适用性试验。针对上述试验结果，血塞通分散片和七叶神安片微生物限度检查，对需氧菌总数的测定宜选用无菌的pH 7.0含3%聚山梨酯-80和0.3%卵磷脂的氯化钠-蛋白胨缓冲液以1:100的稀释级稀释，对霉菌和酵母菌总数的测定宜选用1:10的稀释级。

### 3.4 大肠埃希菌适用性检查结果分析

如表5、表6所示，试验组无菌落生长，说明血塞通分散片和七叶神安片对大肠埃希菌无抑菌性；阳性对照组均能检出大肠埃希菌，而阴性对照组均无菌落生长，故常规增菌培养法可用于控制菌检查。

## 4 结论

血塞通分散片具有提高免疫力和保护心血管等功效<sup>[4]</sup>，七叶神安片具有益气安神和活血止痛等功效<sup>[11-14]</sup>。2种中成药的主要成分为三七不同部位的皂苷，而皂苷类成分具有抑菌性。本研究通过稀释法和添加中和剂联用的方法消除了血塞通分散片和七叶神安片对微生物的抑菌性；本研究结果还表明了常规法适用于对药品进行霉菌和酵母菌总数计数及控制菌的检查，符合《中国药典》2020年版要求。本研究所建立的微生物限度检查方法能够解决含有三七不同部位提取物制剂的微生物检验问题，血塞通分散片和七叶神安片微生物限度检查方法适用性

表 5 含中和剂的大肠埃希菌适用性试验结果

| 样品<br>编号 | 麦康凯液体培养基 |           |           | 麦康凯琼脂培养基 |           |           |
|----------|----------|-----------|-----------|----------|-----------|-----------|
|          | 试验组      | 阳性<br>对照组 | 阴性<br>对照组 | 试验组      | 阳性<br>对照组 | 阴性<br>对照组 |
| A        | -        | +         | -         | -        | +         | -         |
| B        | -        | +         | -         | -        | +         | -         |
| C        | -        | +         | -         | -        | +         | -         |
| D        | -        | +         | -         | -        | +         | -         |

注：- 表示试验结果为阴性；+ 表示试验结果为阳性；表 6 同。

表 6 不含中和剂的大肠埃希菌适用性试验结果

| 样品<br>编号 | 麦康凯液体培养基 |           |           | 麦康凯琼脂培养基 |           |           |
|----------|----------|-----------|-----------|----------|-----------|-----------|
|          | 试验组      | 阳性<br>对照组 | 阴性<br>对照组 | 试验组      | 阳性<br>对照组 | 阴性<br>对照组 |
| A        | -        | +         | -         | -        | +         | -         |
| B        | -        | +         | -         | -        | +         | -         |
| C        | -        | +         | -         | -        | +         | -         |
| D        | -        | +         | -         | -        | +         | -         |

试验可参照本法进行检测，也为不同企业生产的同类品种的微生物限度检查提供参考。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

参考文献

[1] 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,2020:1-3,160-171.

[2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2020:12-13,471-472.

[3] 王莹,褚扬,李伟,等. 三七中皂苷成分及其药理作用的

研究进展[J]. 中草药,2015,46(9):1381-1392.

[4] 段红吉,张洪,来国防,等. 血塞通分散片指纹图谱研究[J]. 云南中医学院学报,2015,38(6):36-41.

[5] 李海舟,张颖君,杨崇仁. 三七叶化学成分的进一步研究[J]. 天然产物研究与开发,2006(4):549-554.

[6] 向胜群,向明利. 七叶神安片的临床应用[J]. 现代医药卫生,2005(24):103-104.

[7] 刘松华,陶健,何凌云. 七叶神安片联合托吡酯治疗偏头痛的临床疗效及对血清 5-羟色胺、降钙素基因相关肽、内皮素-1、同型半胱氨酸的影响[J]. 实验与检验医学,20,41(5):629-631.

[8] 林菁红,林冠,卓振权. 七叶神安分散片联合地西洋治疗焦虑性失眠的临床研究[J]. 现代药物与临床,2018,33(9):2241-2244.

[9] 张华林,郭静,袁春平,等. 三七叶抗抑郁活性提取物 PnGL 中皂苷类成分分析[J]. 中药新药与临床药理,2011,22(6):652-655.

[10] 宋悦,刘森洋,高宇,等. 人参皂苷 Rb<sub>1</sub> 抗炎作用及其机制研究进展[J]. 中国医学创新,2023,20(1):173-178.

[11] 康和利,赵民生,曹秀虹. 七叶神安片的药理学研究及临床应用[J]. 北方药学,2006,3(4):29-30.

[12] 耿家玲,李平华,陆宇照,等. 水提三七叶苷胶囊改善睡眠实验研究[J]. 云南中医中药杂志,2006,27(6):35-36.

[13] 雷伟亚,史栓桃,余思畅. 三七叶总皂甙的镇痛及对中枢神经系统的抑制作用[J]. 中药通报,1984(3):38-41.

[14] 李媛,李强,姜泽. 三七中黄酮类成分的研究进展[J]. 齐鲁药事,2012,31(2):109-111.

(收稿日期: 2024-08-27 编辑: 张双盼)