

Establishment of Microbial Limit Test Assay for Traditional Mongolian Medicine ShaoSha-7 Pills

Song Fushun^{1,†}, Seyinbaoyin^{2,†}, Caolungaowa³, Aodongtana⁴, Bao Siqin⁴, Alatengqimuge⁴, Wuhanqimuge^{4,*}

¹Anesthesiology Department, Inner Mongolia International Mongolian Hospital, Hohhot, China

²Mongolian Medicine Orthopedics Department, Inner Mongolia International Mongolian Hospital, Hohhot, China

³Mongolian Medicine College, Inner Mongolia Medical University, Hohhot, China

⁴Innovative Mongolian Pharmaceutical Preparation Laboratory, Inner Mongolia International Mongolian Hospital, Hohhot, China

Email address:

939839367@qq.com (Wuhanqimuge)

*Corresponding author

† Song Fushun and Seyinbaoyin are co-first authors.

To cite this article:

Song Fushun, Seyinbaoyin, Caolungaowa, Aodongtana, Bao Siqin, Alatengqimuge, Wuhanqimuge. Establishment of Microbial Limit Test Assay for Traditional Mongolian Medicine ShaoSha-7 Pills. *Asia-Pacific Journal of Medicine*. Vol. 1, No. 1, 2018, pp. 1-5.

Received: August 17, 2018; Accepted: December 18, 2018; Published: December 20, 2018

Abstract: This study is aimed at establishing the Microbiological standard for ShaoSha-7 pills by referring to the general provisions 1105 and 1106 of part IV of “Chinese pharmacopoeia” 2015 edition, and supplying the data for improving the quality and ensuring the medical effect of ShaoSha-7 pills. Routine essay, dilution method, membrane-filter procedure and quantitative method were used to examine the microbial of ShaoSha-7 pills and the system suitability of experimental method was tested. Results showed that the recovery for the total number of strains (*Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Monilia albican*, *Aspergillus niger*) was 88-127% when membrane-filter method was used, and the recovery for fungus and yeasts was 87-120% while the bacteria was counted by routine method. Both recoveries met the requirement of pharmacopoeia. For the control strains experiment, *Escherichia coli* and *Salmonella paratyphi B* of ShaoSha-7 pills were detectable through routine method, and *Bile salt resistant gram-negative bacteria* of ShaoSha-7 pills was detectable by quantitative assay, respectively. Meanwhile, no strains were observed in the negative control of both cases, indicating the methods were feasible. Finally, the assay for checking microbial of ShaoSha-7 pills was initially established based on the above results. It supplies the data for setting up the quality control standard, especially microbiological standard for ShaoSha-7 pills.

Keywords: ShaoSha-7 Pills, Microbial Limit Test, System Adaptable Test

蒙药绍沙-7丸微生物限度检查方法的建立

宋福顺¹, 色音宝音², 曹伦高娃³, 奥东塔娜⁴, 包斯琴⁴, 阿拉腾其木格⁴, 乌汉其木格^{4*}

¹内蒙古自治区国际蒙医医院麻醉科, 呼和浩特, 中国

²内蒙古自治区国际蒙医医院蒙医骨伤科, 呼和浩特, 中国

³内蒙古医科大学蒙医药学院, 呼和浩特, 中国

⁴内蒙古自治区国际蒙医医院内蒙古创新蒙药制剂工程实验室, 呼和浩特, 中国

邮箱

939839367@qq.com (乌汉其木格)

摘要: 本研究以拟建立蒙药绍沙-7丸微生物限度检查方法, 为提高质量和保障疗效提供有效依据为目的, 参考《中国药典》2015年版第四部非无菌产品微生物限度检查法(通则1105、1106)相关规定, 采用常规法、稀释法、薄膜过滤

法及定量法对绍沙-7丸的微生物限度检验方法进行了系统适应性试验。结果表明采用薄膜过滤法对本品需氧菌（铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、白色念珠菌、黑曲霉）总数进行检查，回收率均在88-127%之间，而对本品霉菌和酵母菌则采用常规法进行检查，回收率为87-120%，达到药典要求。采用常规法可检出大肠埃希菌和沙门氏菌，用定量法则可检出耐胆盐革兰阴性菌，同时阴性对照组中均没有检出控制菌，表明此方法可行。依据上述方法学验证结果，最后总结出蒙药绍沙-7丸质量标准微生物限度检测方法，为建立其质量标准提供了有效数据。

关键词：绍沙-7丸，微生物限度检查，方法适应性试验

1. 引言

蒙药绍沙-7丸，又称清心广枣七味丸，别名还有七味广枣散、七味广枣丸、芍沙-7、宁芍沙-7和吉如很·芍沙-7[1]等，分别记载于“诊治明医典”[2]、《经验方》[3]、《中国医学百科全书·蒙医学》(1992年版,上海科学技术出版社,第266页)[4]、《蒙医验方》[5]等蒙医药经典著作中。不同著作记载的名称和处方略有不同。蒙药绍沙-7丸对有养心益气、安神宁心、镇静及调理体素功效显著，主要用于胸闷疼痛、心悸气短、心神不安和失眠健忘，在临床上具有几千年的应用历史[2、3、5、6、7]。目前收录于《中国药典》2015年版的七味广枣丸由广枣、沉香、肉豆蔻、木香、丁香、枫香脂、牛心粉组成，其质量执行标准项下规定了性状、鉴别及丸剂项下的检查。而蒙药绍沙-7丸，即清心广枣七味丸由广枣、沉香、肉豆蔻、木香、丁香、枫香脂、兔心粉七味药材组成,目前其执行标准较低，仍没有微生物检查标准[8、9]。由于蒙药处方多，含有多种有效活性成分，部分活性成分会干扰微生物检查结果，因此为了更准确地反应微生物总数，更好地控制其微生物，提高其质量，非常有必要对微生物检查方法进行方法学验证。

2. 仪器与材料

2.1. 仪器

BSC-150011A2-X型100级净化生物安全柜（济南鑫贝西生物技术）；ZF-7型紫外投射仪（上海顾村电光仪器厂）；LRH-150型生化培养箱（上海一恒科学仪器有限公司）；红外消毒器(接种环灭菌器)；RF6000型自动杀菌净手器等。

2.2. 菌种

铜绿假单胞菌（*Pseudomonas aeruginosa*）CMCC(B)10104；枯草芽孢杆菌（*Bacillus subtilis*）CMCC(B)63501；金黄色葡萄球菌（*Staphylococcus aureus*）CMCC(B)26003；大肠埃希菌（*Escherichia coli*）CMCC(B)44102；白色念珠菌（*Candida albicans*）CMCC(F)98001；黑曲霉（*Aspergillus niger*）CMCC(F)98003；乙型副伤寒沙门氏菌（*Salmonella paratyphi B*）CMCC(B)50094均由中国食品药品检定研究院提供。

2.3. 样品

绍沙-7丸(清心广枣七味丸)(批号：20150626；规格：60丸/瓶)由内蒙古自治区国际蒙医医院，国家蒙药制剂中心提供。

2.4. 培养基

胰酪大豆胨琼脂培养基TSA（批号：5275792）；胰酪大豆胨液体培养基TSB（批号：5173596）；沙氏葡萄糖琼脂培养基SDA（批号：5236794）；麦康凯琼脂培养基(批号：4280526)；麦康凯液体培养基(批号：4267510)；RV沙门菌增菌液体培养基（批号：5153988）；木糖赖氨酸脱氧胆酸钠培养基XLD（批号：5049654）；肠道菌增菌液体培养基（批号：4350625）；紫红胆盐葡萄糖琼脂培养基（批号：4314623）；均为北京三药科技开发公司生产。

2.5. 稀释剂及耗材

pH 7.0缓冲蛋白胨水（批号：160121），北京三药科技开发公司生产；无菌滤器（批号：20151130）由泰林公司制造。

3. 实验方法

3.1. 需氧菌总数、霉菌及酵母菌技术方法适应性试验

3.1.1. 铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌菌液制备

取经30~35℃培养18~24小时的铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌新鲜培养物，用0.9%无菌氯化钠溶液制成每1 ml含菌数为5000~10000 cfu的菌悬液。

3.1.2. 白色念珠菌菌液制备

取经20~25℃培养2~3天的白色念珠菌新鲜培养物，用0.9%无菌氯化钠溶液制成每1ml含菌数为5000~10000cfu的菌悬液。

3.1.3. 黑曲霉孢子悬液制备

取经20~25℃培养5~7天的黑曲霉新鲜培养物，加3~5 ml 0.9%无菌氯化钠溶液，将孢子洗脱，吸出孢子悬液至无菌试管内，用0.9%无菌氯化钠溶液制成每1 ml含孢子数为5000~10000 cfu的孢子悬液。

3.2. 供试液制备

称取供试品10g, 置于无菌均质袋中, 加100 ml的pH 7.0无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液, 用均质器拍打1min, 摇匀, 作为1:10的供试液, 备用。

3.3. 常规方法

取1:10供试液9.9 ml和0.1 ml试验菌 (5000~10000 cfu/ml) 混匀, 取1 ml注皿, 平行制备2个平皿。

3.4. 稀释法

取1:10供试液20 ml, 加80 ml的pH 7.0无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液, 摇匀, 制成1:50供试液, 取1:50供试液9.9 ml和0.1 ml试验菌 (5000~10000cfu/ml) 混匀, 取1 ml注皿, 平行制备2个平皿。

3.5. 薄膜过滤法 (300 ml)

取1:10供试液10 ml, 加90 ml的pH 7.0无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液, 摇匀, 制成1:100供试液, 取1:100供试液9.9 ml和0.1 ml试验菌 (5000~10000 cfu/ml) 混匀, 取1 ml加入到薄膜过滤器中, 用pH 7.0无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液冲洗300 ml, 分3次冲洗。

3.6. 回收试验--需氧菌总数、霉菌及酵母菌计数方法适用性试验

3.6.1. 试验组

取上述制备好的供试液加入试验菌, 混匀, 使每1 ml供试液或每张滤膜过的供试液中含菌量不大于100 cfu。

3.6.2. 菌液组

取不含中和剂及灭火剂的相应稀释液代替供试液, 按试验组操作加入试验菌, 测定所加的试验菌数。

3.6.3. 供试品组

取制备好的供试液, 以稀释液代替菌液同试验组操作。

3.6.4. 回收率的计算

细菌回收率=[(试验组平均菌落数-供试品对照组菌落数)/菌液组平均菌落数]×100%

3.7. 验证试验--控制菌检查方法适用性试验

3.7.1. 大肠埃希菌适用性试验-常规法

菌液制备: 同上述菌液的制备法, 制备大肠埃希菌菌液。

(i). 试验组

取上述1:10供试液10 ml及不大于100cfu大肠埃希菌加入100 ml TSB培养基中, 依大肠埃希菌检查法进行增菌培养及选择和分离培养等。

(ii). 阳性对照组

取稀释液10 ml及不大于100 cfu大肠埃希菌加入100 ml TSB培养基中, 依大肠埃希菌检查法进行增菌培养及选择和分离培养等。

(iii). 阴性对照组

取稀释液10 ml加入100 ml TSB培养基中, 依大肠埃希菌检查法进行增菌培养及选择和分离培养等。

3.7.2. 沙门菌适用性试验-常规法

菌液制备: 同前菌液的制备法, 制备沙门菌菌液。

(i). 试验组

取供试品10g及不大于100cfu沙门菌加入200 ml TSB培养基中, 依沙门菌检查法进行增菌培养及选择和分离培养。

(ii). 阳性对照组

取稀释液10 ml及不大于100 cfu沙门菌加入200 ml TSB培养基中, 依沙门菌检查法进行增菌培养及选择和分离培养等。

(iii). 阴性对照组

取稀释液10 ml加入200 ml TSB培养基中, 依沙门菌检查法进行增菌培养及选择和分离培养等。

3.7.3. 耐胆盐革兰阴性菌适用性试验-定量法

(i). 试验组

取相当于0.1g、0.01g、0.001g (或0.1 ml、0.01 ml、0.001 ml) 的供试品各1 ml及不大于100 cfu大肠埃希菌和铜绿假单胞菌分别加入10 ml肠道菌增菌液体培养基中, 按照耐胆盐革兰阴性菌检查法进行增菌培养及紫红胆盐葡萄糖琼脂培养基划线培养等。

(ii). 阳性对照组

取稀释液各1 ml及不大于100 cfu大肠埃希菌和铜绿假单胞菌分别加入10 ml肠道菌增菌液体培养基中, 依耐胆盐革兰阴性菌检查法进行增菌培养及紫红胆盐葡萄糖琼脂培养基划线培养等。

(iii). 阴性对照组

取稀释液1 ml加入10 ml肠道菌增菌液体培养基中, 依耐胆盐革兰阴性菌检查法进行增菌培养及紫红胆盐葡萄糖琼脂培养基划线培养等。

4. 结果分析

4.1. 回收试验--需氧菌总数、霉菌及酵母菌计数方法适用性试验结果

按上述公式计算试验组的回收率, 对需氧菌总数试验结果见表1。一般依据药典要求, 回收率应不低于50%。

表1 需氧菌总数计数方法适用性回收率（%）。

	铜绿假单胞菌	金黄色葡萄球菌	枯草芽孢杆菌	白色念珠菌	黑曲霉
常规法	0	0	0	91	94
稀释法	20	0	70	92	97
薄膜过滤法(300ml)第1次	93	120	126	127	95
薄膜过滤法(300ml)第2次	100	118	88	110	114

表1的实验结果显示，用常规法计数时有三种菌，铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌回收率为零；而用稀释法时金黄色葡萄球菌回收率为零，铜绿假单胞菌回收率也只有20%。因此，常规法和稀释法均不适合需氧菌总数检查。相反，利用薄膜过滤法（300 ml）进行本品的需氧菌总数计数即可使回收率能够达到要求，方法可行。

表2 霉菌和酵母菌计数方法适用性回收率（%）。

	白色念珠菌		黑曲霉	
常规法	第一次	第二次	第一次	第二次
回收率（%）	87	108	98	120

表2中的结果显示用常规法，对本品霉菌和酵母菌进行计数即可使回收率达到要求，87-120%之间方法可行。

4.2. 验证试验--控制菌检查方法适用性试验结果

大肠埃希菌、沙门菌和耐胆盐革兰阴性菌方法验证结果见表3和4。结果显示，阳性菌生长良好，表明本品在该条件下对大肠埃希菌、沙门菌和耐胆盐革兰阴性菌的抑制作用可以忽略不计，阴性对照没有被检出的菌，没有干扰，说明采用常规法进行本品的大肠埃希菌、沙门菌（加200 ml TBS）和耐胆盐革兰阴性菌（定量法）检查可行。

表3 大肠埃希菌和沙门菌控制菌验证结果。

	大肠埃希菌			沙门菌		
	试验组	阳性对照	阳性对照	试验组	阳性对照	阴性对照
第1次	+	+	-	+	+	-
第2次	+	+	-	+	+	+

注：“+”代表检出，“-”表示没有检出。

表4 耐胆盐革兰阴性菌控制菌验证结果。

	大肠埃希菌			铜绿假单胞菌						
	0.1g	0.01g	0.001g	阳性对照	阴性对照	0.1g	0.01g	0.001g	阳性对照	阴性对照
第1次	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
第2次	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+

注：“+”代表检出，“-”表示没有检出。

5. 结论

按照《中国药典》2015年版四部非无菌产品微生物限查的要求对绍沙-7丸需氧菌总数、霉菌及酵母菌计数方法和大肠埃希菌、沙门菌、耐胆盐革兰阴性菌检查方法进行适用性试验,建议制定非无菌产品微生物限度检查方法如下:

取绍沙-7丸供试品10g，置无菌均质袋中，加100 ml 的pH 7.0无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液，用均质器拍打1 min，摇匀，作为1:10的供试液。需氧菌总数计数，取1:10供试液10 ml，加90 ml的pH 7.0无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液，摇匀，制成1:100供试液，取1:100供试液1 ml，经薄膜过滤法处理，用pH 7.0无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液粉刺冲洗（每膜不少于300 ml），取滤膜，依法检查(《中国药典》2015年版四部通则1105);霉菌及酵母菌计数，取1:10供试液1ml，采用平皿法，依法检查(《中国药典》2015年版四部通则1105);大肠埃希菌检查，取1:10供试液10 ml，置胰酪大豆胨液体培养基100 ml中，依法检查(《中国药典》2015

年版四部通则1106);沙门菌检查,取供试品10g置胰酪大豆胨液体培养基200 ml中,依法检查(《中国药典》2015年版四部通则1106);耐胆盐革兰阴性菌检查，取相当于0.1g、0.01g、0.001g的供试品各1 ml，置肠道菌增菌液体培养基10 ml中，依法检查(《中国药典》2015年版四部通则1106)。

6. 讨论

蒙药绍沙-7丸在治疗胸闷疼痛、心悸气短、心神不安和失眠健忘等症疗效非常明显[2、3、5、10-12]，为蒙药治疗心脏疾病重要药物之一，具有深入研究并推广的价值。近年来，生态环境遭到破坏，相似处方的药品也越来越多，其质量和疗效不统一。与此同时，随着现代社会人们对精神及物质生活要求的质量不断提高，传统方法制备的药物显然满足不了现代人和市场的需求[8、9]，必须对其质量制定一个合格的高标准。只有制定了高水准的标准才能有更高质量的蒙药，从而改进其疗效。我们前期研究

中完成了对蒙药清新广枣七味丸的显微鉴别及薄层鉴别方法的建立[13]，本文中对该药微生物检查方法进行了系统适应性试验，并总结建立了其微生物检验方法，这对制定其质量标准提供了有效的数据。

基金项目

“草原英才”工程“蒙药新药研发及产业化创新团队”项目，NO.内组通字【2015】56号；蒙药新药研发及药物实验室的建设项目，No. 2016YJS19。

参考文献

- [1] 王胡格吉乐图,奥乌力吉. 蒙药七味广枣丸研究进展[J].内蒙古民族大学学报, 2013, 28 (1): 91-93。
- [2] 包长山, 额尔敦其木格. 蒙成药治疗冠心病心绞痛的临床观察[J].中国民族医药杂志, 2008 (11): 14 -15。
- [3] 刘萨仁, 金桃, 张春花等. 蒙药绍沙七味丸治疗稳定型劳力性心绞痛的临床研究[J]. 时珍国医国药, 2013, 4 (2): 502-503。
- [4] 白清云主编. 《中国医学百科全书·蒙医学》[M]. 上海科学技术出版社, 1992, 277。
- [5] 娜仁满都拉, 色图雅, 照日格图. 蒙药广枣七味丸治疗冠心病的体会[J]. 中国民族医药杂志, 2004, 1 (1):30。
- [6] 黎明. 蒙药广枣七味丸的药理学进展[J]. 北方药学, 2011, 8 (4):70-71。
- [7] 但春. 丁香和升麻的化学成分研究[D]. 中国科学院, 2006。
- [8] 乌汉其木格, 敖登其木格, 锡林其其格, 特格喜白音, 阿拉腾其木格, 王海荣, 田吉. 蒙药绍沙-7研究进展[J].中国民族医药杂志, 2016, 12 (77-79)。
- [9] 彭春梅, 夏瑶宾, 朱明. 蒙药清心广枣七味丸质量研究[J]. 中国民族医药杂志, 2005, (3): 33-34。
- [10] 才仁·萨拉西. 蒙药广枣七味丸治疗心绞痛临床疗效观察[J]. 世界最新医学信息文摘, 2015, 15 (47): 200-201。
- [11] 孟青春. 蒙药广枣七味丸治疗稳定劳力型心绞痛[J]中国民族医药, 2012 (5): 1-2。
- [12] 孟青春. 蒙药广枣七味丸治疗稳定劳力型心绞痛的体会[J]. 中国民族民间医药, 2012 (6): 12。
- [13] 乌汉其木格, 敖登其木格, 锡林其其格, 特格喜白音, 阿拉腾其木格. 蒙药绍沙-7丸质量标准研究[J].时珍国医国药, 2017, 28 (4): 879-891。