

一种中药丸剂生产全链条微生物负载的研究*

李趣嫦, 江艳芳, 赖珊, 李文靖, 林铁豪

(广东省药品检验所, 广州 510663)

摘要 目的: 研究中药丸剂生产全链条的微生物负载情况。**方法:** 选取一种中药丸剂处方的药材及其净药材、中间体(混合药粉、待内包丸)和成品作为研究对象,按照2020年版《中华人民共和国药典》(简称《中国药典》)微生物限度检查法进行方法建立,对全链条收集的样品进行微生物检测鉴定,分析中药丸剂从药材到成品的微生物负载传递。**结果:** 不同药材的微生物含量差异较大,药材微生物污染风险因子较高的品种为紫苏叶、广藿香和白芷。紫苏叶和广藿香“药材-净药材”的生产工艺需要改进和调整。药材微生物负载与中间体和成品呈现明显的正相关关系。**结论:** 对中成药生产全链条微生物负载的研究,了解各环节微生物的传递情况,有助于发现生产过程的薄弱环节和工艺控制的关键点,对中成药生产企业改进和探索生产工艺有着重要的指导意义。

关键词: 中药丸剂;药材;微生物;生产链;负载

中图分类号: R 917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2024)08-1394-06

doi: 10.16155/j.0254-1793.2024-0192

Study on the whole chain microbial load in the production of one traditional Chinese medicine pills*

LI Qu - chang, JIANG Yan - fang, LAI Shan, LI Wen - jing, LIN Tie - hao

(Guangdong Institute for Drug Control, Guangzhou 510663, China)

Abstract Objective: To study the whole chain microbial load in the production of a traditional Chinese medicine pill. **Methods:** A type of traditional Chinese medicine pills prescription was selected as the research object, including the medicinal materials and their purified medicinal materials, intermediates (mixed powder, waiting for inner packaging pills), and finished products. The microbial limit test method was established according to the 2020 edition of the Chinese Pharmacopoeia (ChP), to detect and analyze the microbial loads of all samples collected throughout the entire chain from medicinal materials to finished products of the traditional Chinese medicine pills. **Results:** The microbial content of different medicinal materials varies greatly, and the varieties with higher risk factors for microbial contamination in medicinal materials were Perillae Folium, Pogostemonis Herba, and Angelicae Dahuricae Radix. The production process of Perillae Folium and Pogostemonis Herba needed to be improved and adjusted from “medicinal material to pure medicinal material”. There was a positive correlation between the microbial load of medicinal materials and intermediate and finished products. **Conclusion:** The study on the microbial load throughout the entire production chain of traditional Chinese patent medicines can help us to understand the transmission of microorganisms at each stage. This knowledge is crucial for identifying weak links

* 广东省药品监督管理局科技创新项目(2023TDZ03);广东省药品监督管理局科技项目引导扶持(2023YDZ05)

第一作者 Tel:(020)32447989;E-mail:157775614@qq.com

in the production process and the key areas for process control, and has an important guiding significance for traditional Chinese patent medicines manufacturers to improve and explore their production process.

Keywords: traditional Chinese medicine pills; medicinal material; microorganisms; production chain; load

近年来,中药材和中药饮片的相关微生物研究报道有很多^[1-8],但中药材与中药饮片作为中成药生产的主要原料,其微生物含量随着药品的生产过程会有怎样的变化,药品生产工艺对药材与中药饮片所带入的微生物进行去除与控制效果等相关研究鲜有报道。本文研究一种中药丸剂从药品生产厂家购回的药材(紫苏叶、姜厚朴、白芷、炒白术、陈皮、广藿香和茯苓),经过相关生产工艺

进行加工后成为净药材,再将净药材粉碎成细粉,按处方混匀,以稀药液为粘合剂制成丸剂的生产全链条微生物负载。探索基于药材-净药材-中间体-成品的微生物分析情况,研判药材微生物污染风险因子;梳理生产工艺对微生物控制的影响及合理性,为中成药生产过程的工艺与微生物控制提供真实研究数据,为推进中成药的现代化、标准化提供依据(图1)。

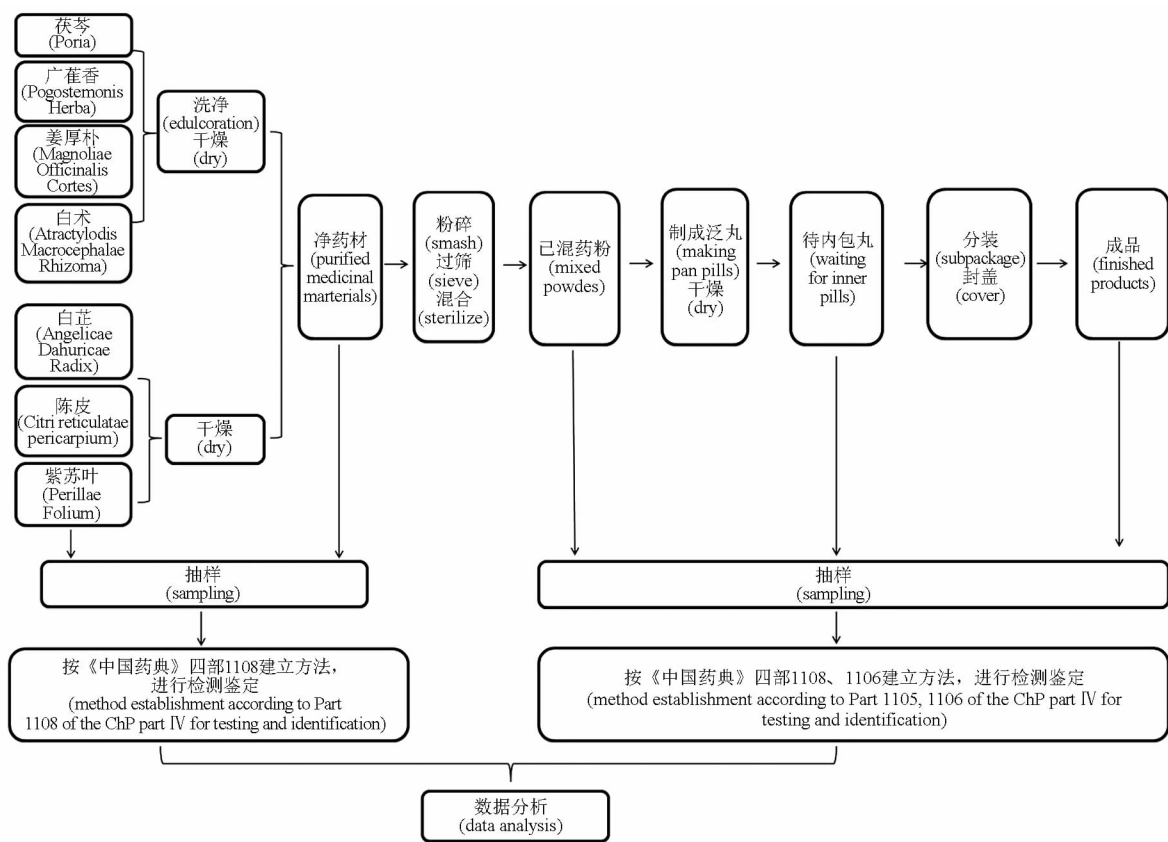


图1 丸剂生产全链条工艺及实验设计方案流程图

Fig. 1 Whole chain process for pill production and scheme of experimental design

1 仪器与材料

1.1 仪器

BRE240型生化培养箱(Froilabo公司); Thermo Scientific 1300 Series A2型生物安全柜(赛默飞世尔科技); JA21002型百分之一精密电子天平(上海舜

宇恒平科学仪器有限公司); Lab dancer 漩涡混合器(IKA艾卡集团); ED型恒温水浴箱(优莱博公司); THZ-103B恒温培养摇床(上海一恒科技有限公司); 全自动快速微生物质谱鉴定系统(Bruker公司)。

1.2 菌种

金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) [CMCC (B)26 003]、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*) [CMCC(B)10 104]、大肠埃希菌(*Escherichia coli*) [CMCC(B)44 102]、乙型副伤寒沙门菌(*Salmonella paratyphi B*) [CMCC(B)50 094]、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) [CMCC63 501]、白色念珠菌(*Candida albicans*) [CMCC(F)98 001]和黑曲霉(*Aspergillus niger*) [CMCC(F)98 003],均购自中国食品药品检定研究院。

1.3 培养基

胰酪大豆胨琼脂(批号 1107371、220412)、含氯霉素沙氏葡萄糖琼脂(批号 210602)、肠道菌增菌液体(批号 210603),购自北京三药科技开发公司。胰酪大豆胨液体(批号 1108531、1111461、1114001)、沙氏葡萄糖液体(批号 1112851)、麦康凯液体(批号 1110651、1111831)、麦康凯琼脂(批号 1105451、1111231)、RV 沙门菌增菌液体(批号 1096141)、木糖赖氨酸脱氧胆酸盐琼脂(批号 1104921)、紫红胆盐葡萄糖琼脂(批号 1101991),购自广东环凯微生物科技有限公司。以上培养基适用性检查均符合 2020 年版《中国药典》规定。

1.4 试药

由丸剂的生产药厂提供一年内收集的药材[紫苏叶(ZSY)、茯苓(FL)、姜厚朴(JHP)、白芷(BZH)、陈皮(CHP)、广藿香(GHX)、白术(BSH)],及处理后的净药材[紫苏叶(ZSYJ)、茯苓(FLJ)、姜厚朴(JHPJ)、白芷(BZHJ)、陈皮(CHPJ)、广藿香(GHXJ)、白术(BSHJ)],制备丸剂的中间体[混合药粉(HF)、待内包丸(BW)和成品(FP)]的全产业链样品作为研究对象,每批抽取量约 300 g。

2 方法与结果

2.1 菌液制备

取金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、铜绿假单胞菌、大肠埃希菌、乙型副伤寒沙门菌、白色念珠菌和黑曲霉,按 2020 年版《中国药典》^[9]的方法制备新鲜培养物,使用前以 0.9% 的无菌氯化钠溶液稀释制成约 $10^3 \sim 10^4$ cfu · mL⁻¹ 或不大于 100 cfu · mL⁻¹ 的菌悬液或孢子悬液。

2.2 供试液的制备

2.2.1 药材和净药材的供试液 取样品 25 g,加入胰酪大豆胨液体培养基 225 mL,振摇荡洗 15 min,制

成 1:10 供试液。

2.2.2 已混药粉、待内包丸及成品的供试液 取供试品 10 g,加入胰酪大豆胨液体培养基至 100 mL,摇匀或用匀浆打碎,制成 1:10 供试液。取上述 1:10 供试液适量,用胰酪大豆胨液体培养基按十倍稀释法稀释成适宜的稀释级供试液。

本研究在方法适用性试验时,如遇到本底菌数负载较大时,将制备好的供试液置水浴(98 ~ 100 °C) 30 min 处理后进行,故耐热菌总数计数的方法系使用需氧菌总数建立的方法进行检测的;再者,中间体和成品的成分和含量基本一致,故本次研究默认中间体的检测方法成品一致。

2.3 方法适用性试验

2.3.1 需氧菌总数、耐热菌总数、霉菌和酵母菌总数 各取 1:10 或 1:50 或 1:100 供试液 10 mL 于灭菌试管中,加入含菌量为 $10^3 \sim 10^4$ cfu · mL⁻¹ 的各试验菌悬液 0.1 mL,使最终含菌量每 1 mL 不大于 100 cfu,混匀,从试管中吸取 1 mL 注入平皿中,立即倾注胰酪大豆胨琼脂或含氯霉素沙氏葡萄糖琼脂,待凝,培养,每株试验菌平行制备 2 个平皿,测定试验组菌落数,同法测定菌液组和供试品对照组的菌落数。

2.3.2 耐胆盐革兰阴性菌、大肠埃希菌和沙门菌 取规定量的样品或 1:10 供试液,接种至相应的培养基中,加入含菌量不大于 100 cfu 的相应菌悬液,混匀后按控制菌检查法进行适用性试验。

2.3.3 适用性试验结果 需氧菌总数、耐热菌总数:除姜厚朴、混合药粉、待内包丸和成品为 1:100 平皿法,其余样品为 1:10 平皿法。

霉菌和酵母菌总数:除姜厚朴为 1:50 平皿法,其余样品为 1:10 平皿法。

耐胆盐革兰阴性菌和大肠埃希菌:直接接种法,培养基体积分别为 10 mL 和 100 mL。

沙门菌:直接接种法,紫苏叶、陈皮、广藿香和姜厚朴的培养基体积为 200 mL,其余样品为 100 mL。

2.4 样品检测

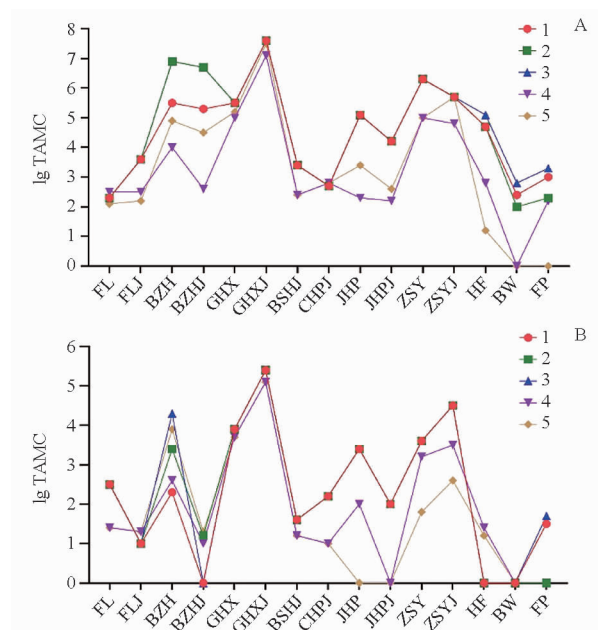
取样品,分别按“2.2”项下方法制备供试液,按照 2020 年版《中国药典》通则 1105、1106 和 1108 依法检查,对生产链条中各样品按所建立的微生物检测方法进行检测,并对需氧菌总数(TAMC)、霉菌和酵母菌总数(TYMC)及耐热菌总数(THRC)的检测结果进行 lg 值的分析,如检测结果小于 10,则默认其

lg 值为 0,对计数平板和控制菌检查的分离平板上的可疑菌落进行分离纯化,用全自动快速微生物质谱鉴定系统进行鉴定分析。

2.5 结果

2.5.1 生产链条微生物负载情况

本丸剂所使用药材及其净药材微生物负载量总体情况较理想。参考 EP 和 JP 标准^[10-11],煎煮类饮片的需氧菌总数的限度为 10^7 (lg 值为 7),霉菌和酵母菌总数的限度为 10^5 (lg 值为 5),采用“5 倍因子”的方式控制结果判断,所有药材及其净药材的需氧菌总数与霉菌和酵母菌总数均能达到要求(图 2)。姜厚朴、白术、陈皮和茯苓的药材或净药材微生物负载量较低;微生物负载量较高的品种为紫苏叶、广藿香和白芷。



1~5. 5 个批次样品 (5 lots of sample)

图 2 生产链条的需氧菌总数 (A)、霉菌和酵母菌 (B) 负载量

Fig. 2 TAMC (A) and TYMC (B) load in the production chain

1~3 批次产品投入的药材批次基本一致,整个生产链的微生物负载走向也基本一致,说明当前生产工艺稳定;4~5 批次投入的药材的微生物总负载较前 3 批次低,中间体到成品的微生物负载也较前 3 批次低(图 2),提示生产链中微生物负载的传递呈现明显的正相关关系,遵循现有的生产工艺,从药材源头把控微生物的含量能有效减少产品的中间体和成品的微生物负载。

对生产链条收集的样品的计数平板和控制菌

分离平板上菌落进行分离鉴定,鉴定结果见图 3。从药材分离出 28 种污染菌,其中含克罗诺杆菌属、神户肠杆菌、阴沟肠杆菌、鲍曼不动杆菌、大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌、蜡样芽孢杆菌等致病菌和条件致病菌。从中间体“混合药粉和待内包丸”共检出短小芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌、温热泛栖菌、伤口假埃希菌、莫哈维芽孢杆菌、灰尘弗兰科尼氏菌、地衣芽孢杆菌、阴沟肠杆菌和索诺兰沙漠芽孢杆菌 9 种污染菌;在成品计数平板上检出枯草芽孢杆菌和莫哈维芽孢杆菌。提示本产品当前工艺能有效去除药材带入的不可接受微生物,且本产品为非无菌制剂,微生物一直处于符合标准内的水平,近 5 年鲜少出现不良反应案例,不可接受微生物污染风险很低。

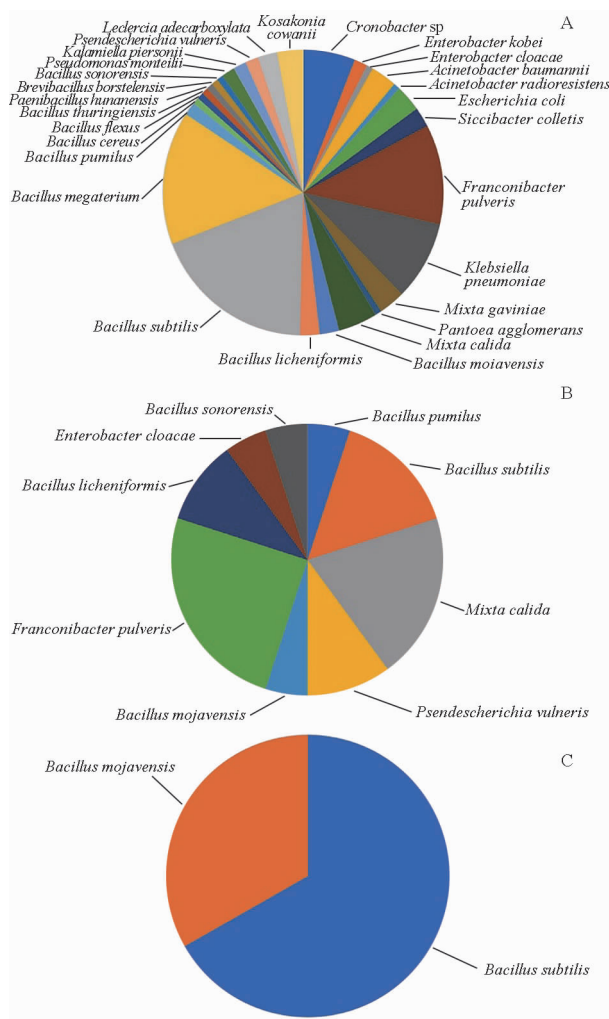


图 3 药材 (A)、中间体 (B)、成品 (C) 微生物鉴定分析

Fig. 3 Microbial identification and analysis of medicinal materials (A), intermediates (B) and finished products (C)

2.5.2 生产链条耐胆盐革兰阴性菌负载情况 收集的 21 批药材中,耐胆盐革兰阴性菌污染量在 $10^5 \sim 10^6 \text{ cfu} \cdot \text{g}^{-1}$ 和 $10^4 \sim 10^5 \text{ cfu} \cdot \text{g}^{-1}$ 的各占比约为 10%,在 $10^2 \sim 10^3 \text{ cfu} \cdot \text{g}^{-1}$ 的占比约为 20%,不超过 $10^2 \text{ cfu} \cdot \text{g}^{-1}$ 的占比约为 60%;净药材的耐胆盐革兰阴性菌污染量在 $10^4 \sim 10^5 \text{ cfu} \cdot \text{g}^{-1}$ 的各占比约为 5%,在 $10^3 \sim 10^4 \text{ cfu} \cdot \text{g}^{-1}$ 的各占比约为 15%,在 $10^2 \sim 10^3 \text{ cfu} \cdot \text{g}^{-1}$ 的各占比约为 10%,不超过 $10^2 \text{ cfu} \cdot \text{g}^{-1}$ 的占比约为 70%;已混药粉、待内包丸及成品均 $< 10 \text{ cfu} \cdot \text{g}^{-1}$ 。见表 1。耐胆盐革兰阴性菌负载量在药品生产过程中逐渐下降到药典标准规定(不超过 $10^2 \text{ cfu} \cdot \text{g}^{-1}$)范围内,提示耐胆盐革兰阴性菌可作为工艺控制的相关控制参数。

表 1 耐胆盐革兰阴性菌检测结果
Tab. 1 Detection results of bile-tolerant gram-negative bacteria

名称 (sample)	批号 (batch No.)	药材 (medicinal material)/ ($\text{cfu} \cdot \text{g}^{-1}$)	净药材 (pure medicinal material)/($\text{cfu} \cdot \text{g}^{-1}$)
FL	FL1	$10^1 < N < 10^2$	$N < 10$
	FL2	$N < 10$	$N < 10$
	FL3	$N < 10$	$N < 10$
BZH	BZH1	$10^5 < N < 10^6$	$N < 10$
	BZH2	$N < 10$	$N < 10$
	BZH3	$10^4 < N < 10^5$	$N < 10$
	BZH4	$N < 10$	$N < 10$
	BZH5	$10^4 < N < 10^5$	$10^3 < N < 10^4$
GHX	GHX1	$10^2 < N < 10^3$	$10^3 < N < 10^4$
	GHX2	$10^1 < N < 10^2$	$N < 10$
	GHX3	$10^1 < N < 10^2$	$N < 10$
BSH	BSH	/	$10^1 < N < 10^2$
CHP	CHP	$N < 10$	$N < 10$
JHP	JHP1	$10^5 < N < 10^6$	$10^4 < N < 10^5$
	JHP2	$N < 10$	$N < 10$
	JHP3	$N < 10$	$N < 10$
	JHP4	$N < 10$	$N < 10$
	JHP5	$N < 10$	$N < 10$
ZSY	ZSY1	$10^2 < N < 10^3$	$10^2 < N < 10^3$
	ZSY2	$10^2 < N < 10^3$	$10^2 < N < 10^3$
	ZSY3	$10^2 < N < 10^3$	$10^3 < N < 10^4$

注 (note): N 代表可能菌数 (N represents the possible bacterial count)

2.5.3 药材及净药材耐热菌负载情况 药材耐热菌结果,茯苓、陈皮和姜厚朴均为 $< 10 \text{ cfu} \cdot \text{g}^{-1}$,白芷批次之间负载差异较大。见图 4。检出枯草芽孢杆菌

菌、波茨坦短芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌、蜡样芽孢杆菌、短小芽孢杆菌和嗜湖短芽孢杆菌,共 7 株污染菌,均为芽孢杆菌类细菌。其中枯草芽孢杆菌检出率最高,提示从成品检出枯草芽孢杆菌为药材传递而来。见图 5。

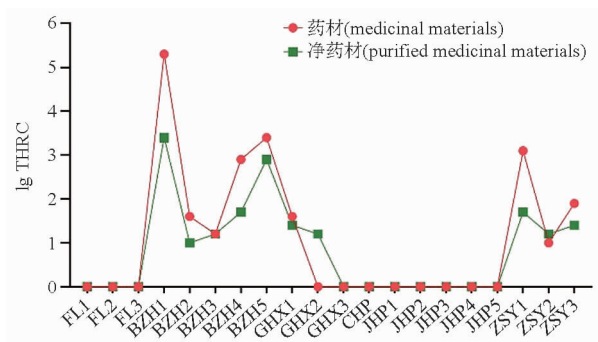


图 4 耐热菌负载

Fig. 4 THRC Load

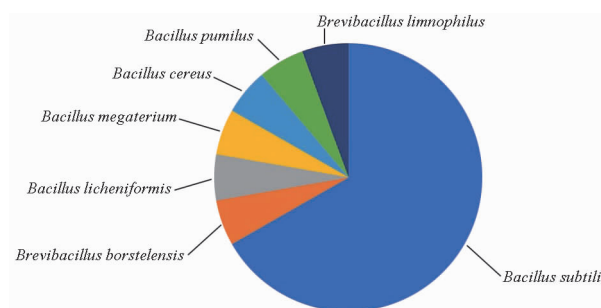


图 5 耐热菌鉴定分析

Fig. 5 Identification and analysis of THRC

3 讨论

白芷药材批次之间微生物负载相差较大,提示提高药材生产的标准化程度可控制微生物负载;紫苏叶药材与净药材的微生物负载并没有明显变化,说明当前紫苏叶“药材-净药材”的生产工艺处理对降低其微生物负载没有实质性贡献。广藿香在“药材-净药材”的生产工艺处理后,需氧菌总数、霉菌和酵母菌总数有所上升,提示企业在后续工作中急需进一步做相关数据积累,对广藿香净药材微生物负载的处理工艺进行改进和完善,通过工艺控制减少微生物的污染。

从丸剂生产全链条工艺(图 2)及研究结果发现,本丸剂生产过程中微生物控制的关键点为:①药材的品质直接影响有效成分及微生物的原始负载,应严格把关,设计合理的验收程序;②药材经过除杂,洗净,干燥等工艺是降低净药材微生物负载的关键点,应合理

设计工艺并监测效果;③净药材经过粉碎、混合后进行灭菌是去除微生物重要工艺,应监测灭菌效果。

本次研究发现生产企业有多个中成药品种,生产量大,药材使用量大,且同一药材有共用在多个品种上,故收集全链条的药材和净药材的样品有一定难度,在传递链上样品抽样有缺失。在日常生产中,如需对某一具体中成药品种的每批次药品从“药材-净药材-中间体-成品”的生产全过程的对微生物负载进行日常检验监测,会大大增加企业的工作量、成本,拖累效益;发现问题要对生产工艺改进时需要研究、重新注册等,耗时费力,多重原因导致企业“不能做,不想做。”应探索有效的解决方法;如基于风险评估把每批次检验改为定期抽检或对重点品种进行监测;探索中药材,药材饮片各种节能、快速、有效的微生物检测新方法、新模式^[13-16];优化药品注册流程;对中药材和中药饮片的种植,采收等全链条生产环节标准化水平的提高等。

参考文献

- [1] 沈泓, 孙晗, 何凯伦, 等. 10 种常见中药饮片微生物污染相关因素研究[J]. 现代应用药学, 2022, 39(10): 1317
SHEN H, SUN H, HE KL, *et al.* Study on the related factors of microbial contamination in 10 kinds of Chinese materia medica decoction [J]. *Chin J Mod Appl Pharm*, 2022, 39(10): 1317
- [2] 杨昊, 周爽, 杨戈, 等. 市售 11 种煎煮类中药饮片微生物污染情况考察[J]. 药学研究, 2023, 42(5): 321
YANG H, ZHOU S, YANG G, *et al.* Investigation of microbial contamination for 11 kinds of traditional Chinese medicine decoction pieces for sale [J]. *J Pharm Res*, 2023, 42(5): 321
- [3] 杨美琴, 胡昌勤, 刘鹏, 等. 中药饮片微生物污染量调查分析[J]. 中国药学杂志, 2021, 56(20): 1671
YANG MQ, HU CQ, LIU P, *et al.* Research and analysis about microbial quantity contamination of prepared slices of Chinese crude drugs [J]. *Chin Pharm J*, 2021, 56(20): 1671
- [4] 孙莺, 王玉梅, 尉鹏, 等. 甘肃两种地道药材当归及党参中药饮片中微生物污染状况研究[J]. 西部中医药, 2022, 35(4): 17
SUN Y, WANG YM, WEI P, *et al.* Study on microbial contamination of two genuine medicinal materials Danggui and Dangshen in Gansu province [J]. *Western J Tradit Chin Med*, 2022, 35(4): 17
- [5] 孙晓朋, 张丹, 刘菊, 等. 中药饮片虎掌南星微生物污染状况分析[J]. 中国药品标准, 2023, 24(1): 25
SUN XP, ZHANG D, LIU J, *et al.* Analysis of microbial contamination of *Pinellia pedatisecta* in prepared slices of Chinese crude drugs [J]. *Drug Stand China*, 2023, 24(1): 25
- [6] 朱文娟, 黎丽敏, 李锦妹, 等. 3 种半夏饮片的微生物污染状况考察[J]. 中南药学, 2022, 20(5): 1153
ZHU WJ, LI LM, LI JM, *et al.* Microbial contamination of 3 kinds of *Pinelliae Rhizome* [J]. *Central South Pharm*, 2022, 20(5): 1153
- [7] 尹良军, 杨晓莉, 王文娟, 等. 中药饮片金银花、菊花微生物限度检查方法研究[J]. 药品评价, 2022, 19(10): 585
YIN LJ, YANG XL, WANG WJ, *et al.* Study on microbial limit test method of honeysuckle and chrysanthemum [J]. *Drug Eval*, 2022, 19(10): 585
- [8] 甘永琦, 农浚, 零文超, 等. 广西等地区 9 种中药饮片微生物污染状况分析[J]. 中国药师, 2018, 21(5): 922
GAN YQ, NONG J, LING WC, *et al.* Analysis of microbial contamination of 9 kinds of Chinese herbal pieces in Guangxi and other areas [J]. *China Pharm*, 2018, 21(5): 922
- [9] 中华人民共和国药典 2020 年版. 四部[S]. 2020:140
ChP 2020. Vol IV [S]. 2020:140
- [10] EP 10.0 [S]. 2019:201
- [11] JP 17 [S]. 2016:138
- [12] 张丹丹. 中药材储存中存在的问题及管理措施[J]. 中国民族医学, 2021, 33(7): 123
ZHANG DD. Brief discussion on problems and management measures in storage of Chinese medicinal materials [J]. *Med J Chin People's Health*, 2021, 33(7): 123
- [13] 李秀珍, 刘风琴, 李婷婷, 等. 水活度用于中药饮片微生物污染控制的探讨[J]. 中国药事, 2021, 35(5): 552
LI XZ, LIU FQ, LI TT, *et al.* On the use of water activity to control microbial contamination of TCM decoction pieces [J]. *Chin Pharm Aff*, 2021, 35(5): 552
- [14] 史亚, 赵红霞, 刘程智, 等. 中药饮片中微生物的快速检测技术研究及风险评估方法初探[J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(4): 461
SHI Y, ZHAO HX, LIU CZ, *et al.* Study on microorganism rapid detection technology and risk assessment of Chinese herbal medicines [J]. *Chin J Mod Appl Pharm*, 2019, 36(4): 461
- [15] 李琼琼, 范一灵, 宋明辉, 等. 基于高通量测序的 6 类中药饮片污染微生物群落特征分析[J]. 药物分析杂志, 2019, 39(11): 1945
LI QQ, FAN YL, SONG MH, *et al.* Microbial community composition analysis of six Chinese herbal pieces through 16S rRNA high-throughput sequencing [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2019, 39(11): 1945
- [16] 陈玲, 陈维, 刘振杰, 等. 中药饮片有害微生物负载及鉴定技术研究进展[J]. 微生物学通报, 2022, 49(7): 2838
CHEN L, CHEN W, LIU ZJ, *et al.* Progress on contamination and identification methods of harmful microorganisms in Chinese herbal medicines [J]. *Microbiol China*, 2022, 49(7): 2838
- [17] 郑海, 王如意, 郑怡, 等. 干燥和储存方式对广藿香有效成分的影响[J]. 安徽农业科学, 2024, 52(6): 170
ZHENG H, WANG RY, ZHENG Y, *et al.* Effect of drying and storage on the active ingredients of *Pogostemon cablin* [J]. *Anhui Agric Sci*, 2024, 52(6): 170

(本文于 2024 年 3 月 24 日收到)