

# ATP生物发光技术结合统计分析方法应用于柴胡饮片微生物污染快速判断

张泽帅<sup>1</sup>, 谢茂梅<sup>1</sup>, 文有青<sup>1</sup>, 颜月玲<sup>1</sup>, 李 正<sup>1,2,3</sup>, 王海霞<sup>1,2,3\*</sup>

(1. 天津中医药大学中药制药工程学院, 天津 301617; 2. 天津中医药大学组分中药国家重点实验室, 天津 301617; 3. 现代中医药海河实验室, 天津 301617)

**摘要:** 本研究聚焦中药饮片微生物质量控制, 针对传统培养法检测速度慢和无法检测不可培养微生物等缺陷, 建立一个基于ATP生物发光技术结合统计分析方法快速预判和定量检测柴胡饮片中污染需氧菌总数 (TAMC) 和霉菌酵母菌总数 (TYMC) 的新方法。基于优化的ATP生物发光检测体系, 可实现对大肠埃希菌、枯草芽孢杆菌和金葡菌纯菌液液的准确检测, 检测限分别为47.86、89.13和1 862.09 CFU·mL<sup>-1</sup>, 检测时间为6.5 h, 检测成本低。分别以10%和20%误判率划定TAMC预警上限和预警下限, 以20%误判率划定TYMC预警限, 提出的交叉交叉法可对柴胡饮片微生物污染数量进行快速预判。构建的偏最小二乘回归 (PLSR) 模型可以对柴胡饮片微生物污染数量进行准确定量, 其中, 对TAMC总量的最优PLSR预测模型的校正系数 ( $R^2$ ) 为0.826, 校正集均方根误差 (RMSE<sub>E</sub>) 为0.468, 交叉验证集均方根误差 (RMSE<sub>CV</sub>) 为0.465, 对TYMC总量的预测模型中  $R^2$  为0.778, RMSE<sub>E</sub> 为0.543, RMSE<sub>CV</sub> 为0.541。本研究旨在建立一套中药材和中药饮片微生物限度快速检测方法和预测模型, 为中药产品微生物质量过程控制提供一项更为便捷和灵敏的检测技术。

**关键词:** ATP生物发光技术; 统计分析; 中药饮片; 柴胡; 微生物限度

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2023)10-2922-09

## Rapid determination of microbial contamination of *Bupleurum chinense* DC. decoction slices by ATP bioluminescence technology combined with statistical analysis methods

ZHANG Ze-shuai<sup>1</sup>, XIE Mao-mei<sup>1</sup>, WEN You-qing<sup>1</sup>, YAN Yue-ling<sup>1</sup>, LI Zheng<sup>1,2,3</sup>, WANG Hai-xia<sup>1,2,3\*</sup>

(1. College of Pharmaceutical Engineering of Traditional Chinese Medicine, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China; 2. State Key Laboratory of Component-based Chinese Medicine, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China; 3. Haihe Laboratory of Modern Chinese Medicine, Tianjin 301617, China)

**Abstract:** This study focuses on the microbial quality control of the Chinese herbal decoction pieces. In view of the shortcomings of traditional culture methods such as slow detection speed and inability to detect unculturable microorganisms, a new method based on ATP bioluminescence technology combined with statistical analysis methods was established to rapidly predict and quantitatively detect the total aerobic microbial count (TAMC) and total yeast and mold count (TYMC) contaminated *Bupleurum chinense* DC. decoction pieces. Based on the optimized ATP bioluminescence detection system, accurate detection of pure bacterial solution of *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus* can be achieved, with detection limits of 47.86, 89.13 and 1 862.09 CFU·mL<sup>-1</sup>,

收稿日期: 2023-02-22; 修回日期: 2023-04-26.

基金项目: 国家自然科学基金项目 (82003944); 国家中医药多学科交叉创新团队项目 (ZYCYXTD-D-202002); 现代中医药海河实验室科研项目 (22HHZYSS00006); 天津市科技计划项目 (22YDTPJC00380).

\*通讯作者 Tel: 18920903702, E-mail: whxtcm@tjutcm.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2023-0207

respectively. The detection time was 6.5 h, and the detection cost was as low as 2 yuan/time. The upper and lower warning limits of TAMC were determined by the misjudgment rates of 10% and 20%, respectively. And the warning limit of TYMC was determined by the misjudgment rate of 20%. The proposed crossing method could quickly predict the amount of microbial contamination in *Bupleurum chinense* DC. decoction pieces. The constructed partial least squares regression (PLSR) model could accurately quantify the quantity of microbial contamination in *Bupleurum chinense* DC. decoction pieces. The optimal PLSR prediction model for TAMC had a correction coefficient ( $R^2$ ) of 0.826, a root mean square error of correction set ( $RMSE_E$ ) of 0.468 and a root mean square error of cross-validation set ( $RMSE_{CV}$ ) of 0.465. The  $R^2$ ,  $RMSE_E$  and  $RMSE_{CV}$  in the prediction model of TYMC were 0.778, 0.543 and 0.541, respectively. The aim of this study is to establish a kind of rapid detection method and prediction models for the microbial limit of traditional Chinese medicine and Chinese herbal decoction pieces, and to provide a more convenient and sensitive detection technology for the microbial quality process control of traditional Chinese medicine products.

**Key words:** ATP bioluminescence technology; statistical analysis; Chinese herbal decoction pieces; *Bupleurum chinense* DC.; microbial limit

中药饮片是中药材经炮制处理,用于调剂、制剂和临床需要的一类中药产品。中药饮片是中药产业三大支柱之一,饮片质量问题直接关系产业的稳定发展<sup>[1,2]</sup>。由于中药材原料来源不稳定,炮制工艺多样以及饮片储藏和运输环节等因素,中药饮片整体微生物污染问题较为严重,存在较高安全风险<sup>[3-5]</sup>。中药饮片微生物限度检查法用于检查中药材及中药饮片的微生物污染程度,其中,需氧菌总数 (total aerobic microbial count, TAMC) 和霉菌和酵母菌总数 (total yeast and mold count, TYMC) 是药典规定的中药饮片微生物安全质量控制的重要指标<sup>[6]</sup>。通过对17个省市药检所国内市场采购的151种2 286批饮片样本进行微生物污染调查<sup>[7]</sup>,结果显示TAMC污染范围在 $1 \times 10^2 \sim 1 \times 10^7$  CFU·g<sup>-1</sup>, TYMC污染范围在 $10 \sim 1 \times 10^5$  CFU·g<sup>-1</sup>,约3%煎煮类饮片不能满足欧洲药典/日本药典要求,17%煎煮类饮片不能满足美国药典要求。柴胡作为中药大宗饮片,临床和制剂需求量均较大,因此柴胡饮片质量安全问题更加不容忽视。鉴于柴胡入药部位为根部,长期与土壤密切接触,微生物污染风险偏高,因此务必更加重视微生物限度检测和控制<sup>[8,9]</sup>。

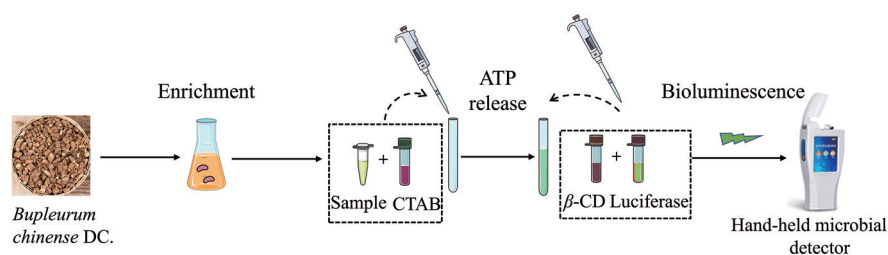
目前,培养计数法是微生物限度检查的金标准,同时被各国药典采纳作为微生物检查常规方法。但鉴于微生物生长的周期性及存在不可培养情况,培养法存在检测速度慢和无法检测到不可培养微生物等缺陷。《2020版中华人民共和国药典》新增了“1021细菌DNA特征序列鉴定法”<sup>[10]</sup>用于药品质量控制中微生物的鉴定分类,但是该方法存在检测成本较高和定量准确度较差等不足,较难适用于微生物限度快速检查。

腺嘌呤核苷三磷酸 (adenosine triphosphate, ATP) 存在于一切活细胞内,单个活细菌ATP一般稳定在

$1 \times 10^{-18}$  mol。在荧光素酶裂解剂存在时会促使微生物细胞体内的ATP释放,继而引发酶促反应并释放荧光<sup>[11,12]</sup>。ATP生物发光技术就是基于荧光素酶促反应原理,将微生物体内的ATP转化为光子,再利用光度计收集光子信号转换为相对发光单位 (relative light unit, RLU),作为微生物定量检测的依据。该方法在有氧条件下几乎可以检测到所有活的微生物,而且从样品前处理到获得检测结果一般不超过10 min,适用于微生物污染总数快速检测<sup>[13]</sup>。目前ATP生物发光法已被列入我国食品接触表面消毒效果评价的国家标准。除了应用在卫生状况评价方面外,ATP生物发光法在酒品<sup>[14]</sup>及化妆品<sup>[15,16]</sup>微生物限度检测和空气微生物污染监控<sup>[17]</sup>方面均有报道。Zhai等<sup>[18]</sup>通过选取6类化妆品和7类菌株,对菌落总数和TYMC进行了验证,结果表明ATP生物荧光增幅法与标准方法具有部分等效性,可推广应用于化妆品及相关领域生产过程监控及出厂放行检验中的微生物污染样品快速筛查。但该方法在中药材及中药饮片的微生物限度快速检测方面还鲜有应用。本研究首次提出应用ATP生物发光技术结合统计分析方法应用于柴胡饮片微生物限度快速判断,旨在建立一套中药饮片微生物限度快速检测方法和预测模型,为中药产品微生物质量过程控制和放行提供一项更为便捷和灵敏的检测技术。检测过程如图1所示。

## 材料与amp;方法

**试剂** 十六烷基三甲基溴化铵 (cetyl trimethyl ammonium bromide, CTAB; 批号: SLBZ1792, 纯度  $\geq 99\%$ ) 购自美国 Sigam-Aldrich 公司;  $\beta$ -环糊精 (beta-cyclodextrin,  $\beta$ -CD, 批号: 190607) 购自安徽山河药用股份有限公司; 三羟甲基氨基甲烷 (hydroxymethyl



**Figure 1** Schematic illustration of operating principle for microbial detection via ATP bioluminescence method. CTAB: Cetyl trimethyl ammonium bromide;  $\beta$ -CD: Beta-cyclodextrin; ATP: Adenosine triphosphate

aminomethane, Tris; 批号: C919BA0003, 纯度 > 99.9%)、牛血清蛋白 (bovine serum albumin, BSA; 批号: C902BA0001, 纯度 > 96%) 和肉汤培养基 (批号: E911KA9553) 购自上海生工生物工程股份有限公司; 醋酸镁 (批号: C14247427, 纯度 > 99%) 和二巯基苏糖醇 (dimercaptothreitol, DTT; 批号: C13513537, 纯度 > 99%) 购自上海麦克林生化科技有限公司; 乙二胺四乙酸二钠盐二水合物 (批号: J08HS183525, 纯度 > 99%) 购自上海源叶生物科技有限公司; 荧光素和荧光素酶基底 (批号: 0000524777) 购自美国 Promega 公司; pH 7.4 磷酸盐缓冲液 (phosphate buffer, PBS; 批号: 20211130) 购自北京索莱宝科技有限公司; pH 7.0 氯化钠蛋白胨缓冲液 (批号: 20220518)、胰酪大豆琼脂培养基 (trypticase soy agar, TSA; 批号: 20220616)、胰酪大豆胨液体培养基 (trypticase soy broth, TSB; 批号: 20210112) 购自北京奥博星生物技术有限责任公司; 沙氏葡萄糖琼脂培养基 (sabouraud dextrose agar, SDA; 批号: 2080861) 购自美国 BD 公司。其他试剂均为分析纯, 所有溶液均用超纯水配制。Tris 缓冲液由 25 mmol·L<sup>-1</sup> Tris, 25 mmol·L<sup>-1</sup> 醋酸镁, 2.5 mmol·L<sup>-1</sup> DTT, 2.5 mmol·L<sup>-1</sup> 乙二胺四乙酸二钠盐二水合物和 1 mg·mL<sup>-1</sup> BSA 组成。柴胡样本分别来自安徽、甘肃和河北三个不同产地, 由天津中医药大学宋新波研究员鉴定为柴胡饮片。所有柴胡饮片均购自安徽亳州万珍中药饮片厂, 批次分别为 2105016、2105017、2105022、2107024、2107025 和 2107026。

**菌株** 大肠埃希菌 (*Escherichia coli*, *E. coli*, CICC 10372)、金葡菌 (*Staphylococcus aureus*, *S. aureus*, CICC 10473) 和枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*, *B. subtilis*, CICC 10002) 均购自中国工业微生物菌种保藏管理中心 (China center of industrial culture collection, CICC)。

**仪器** LR-150F 生化培养箱 (上海一恒科学仪器有限公司); ZWY-240 恒温培养振荡器 (上海智城分析仪器股份有限公司); 1850A-142 立式压力蒸汽灭菌器 (上海博迅实业有限公司医疗设备厂); SW-CJ-IF 超净工作台 (苏州净化厂); HM-ATP 荧光检测仪 (山东恒美

电子科技有限公司); AL204 型电子天平 (美国梅特勒-托利多仪器有限公司); H1650 R 台式高速冷冻离心机 (湖南湘仪实验室仪器开发有限公司)。

**ATP 生物发光法检测优化方法** ATP 生物发光法的检测原理是荧光素酶促反应, 其中, 荧光检测试剂、反应时间、裂解剂和保护剂对 ATP 生物发光强度都有重要影响。称取适量荧光素-荧光素酶基底, 加入提前配制好的 Tris 缓冲液, 配制不同浓度荧光检测试剂 (1、2、3、4 和 5 mg·mL<sup>-1</sup>), 室温稳定 20 min 后使用。将 100  $\mu$ L 大肠埃希菌纯菌液加入发光检测管内, 再加入 50  $\mu$ L CTAB, 静置 2 min, 然后加入 50  $\mu$ L  $\beta$ -CD, 接着加入 100  $\mu$ L 配制好的荧光检测试剂, 震荡约 10 s 后, 插入 ATP 荧光测试仪内累积 15 s 后读取 RLU。在保证其他测试条件一致的前提下, 考察荧光检测试剂浓度对 ATP 生物发光强度的影响。同理, 依次考察震荡时间 (0、5、10、15 和 20 s), CTAB 浓度 (0.5、2.5、5、7.5 和 10 mmol·mL<sup>-1</sup>) 和  $\beta$ -CD 浓度 (2.5、5、7.5、10 和 12.5 mmol·mL<sup>-1</sup>) 等条件对 ATP 生物发光的影响, 确定最佳检测条件。

**ATP 标准样本和细菌样本检测方法** 配制浓度范围在  $1 \times 10^{-19} \sim 1 \times 10^{-12}$  mol·mL<sup>-1</sup> 的 ATP 标准液, 分别量取 100  $\mu$ L ATP 样液, 按照 ATP 生物发光检测方法平行测定三次。选择革兰阴性菌和阳性菌的代表大肠埃希菌和金葡菌, 及柴胡饮片样本的主要负载菌枯草芽孢杆菌这三种菌进行检测。挑取斜面培养基中的大肠埃希菌、金葡菌和枯草芽孢杆菌单菌落溶解于 10 mL 肉汤培养液内, 140 r·min<sup>-1</sup>、35  $^{\circ}$ C 条件下培养 16 h。量取 1 mL 培养上清液置于无菌离心管内, 在 4 000 r·min<sup>-1</sup>、4  $^{\circ}$ C 条件下离心 18 min, 弃去上清液, 加入 1 mL PBS, 重复上述离心操作三次, 即得原纯菌液。采用 PBS 对纯菌液按 10 倍梯度稀释为数量级在  $10 \sim 1 \times 10^9$  CFU·mL<sup>-1</sup> 的样本, 分别量取 100  $\mu$ L 纯菌液样本, 按照 ATP 生物发光检测方法平行测定三次。

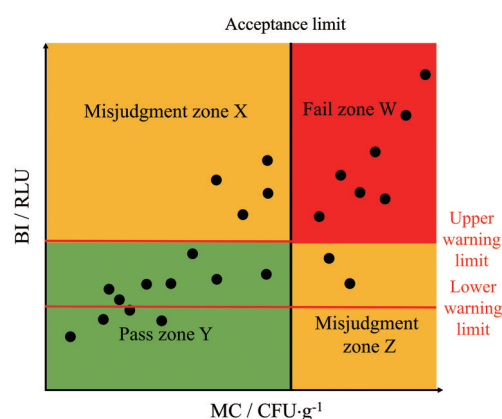
**柴胡样本前处理工艺优化方法** 震荡时间是影响柴胡饮片供试液制备的关键因素, 由于《2020 版中华人民共和国药典》“1108 中药饮片微生物限度检查法”对供试液制备中震荡时间这一个关键参数只作了“不少

于15 min”的说明,因此有必要对震荡时间进行优化。称取柴胡饮片25 g置于锥形瓶内,加入225 mL灭菌处理过的pH 7.0氯化钠蛋白胨缓冲液,转速300 r·min<sup>-1</sup>,温度35 °C,分别考察震荡时间为15、30、45和60 min对生物发光强度的影响。取震荡液的上清液作为供试液,并进行梯度稀释。取合适稀释度供试液100 μL分别涂布于TSA和SDA, TSA用于TAMC计数, SDA用于TYMC计数。在对柴胡饮片震荡液进行ATP生物发光检测时发现其信号值普遍偏低,推测原因可能是柴胡震荡液中有部分有效活性物质浸出,干扰或者掩盖荧光信号。因此,考虑在检测之前添加预增菌工艺,放大其生物发光信号,重点对增菌时间进行优化。按照优化后的震荡条件得到柴胡样本供试液,量取2 mL加入到18 mL TSB中,在转速140 r·min<sup>-1</sup>,温度为35 °C时选用摇床增菌培养,分别于0、2、4、6和8 h取样,按照ATP生物发光法检测获得RLU,从而确定最佳预增菌时间。

**结合十字交叉法的柴胡样本微生物污染判断方法** 选择安徽、甘肃和河北3个不同产地的柴胡样本,分组对其进行常温、低温和真空低温保藏,如表1所示共获得了9组微生物污染情况各异的柴胡样本,每组检测样本数在10~16个。按照优化后的前处理方法,获得柴胡饮片供试液,取一部分供试液进行平板培养法检测,获得TAMC和TYMC值。取另一部分供试液预增菌处理后,按照优化后的ATP生物发光法进行检测,获得发光强度值。通过ATP生物发光测试技术与十字交叉数据分析法的结合,对待测柴胡样品的微生物污染等级进行快速预判。《2020版中华人民共和国药典》规定中医临床用饮片TAMC限度标准为1×10<sup>5</sup> CFU·g<sup>-1</sup>, TYMC的限度标准为1×10<sup>3</sup> CFU·g<sup>-1</sup>,本研究借鉴用于划定柴胡饮片微生物含量合格限,如图2所示纵向合格限。同时,以ATP生物发光强度值的误判率划定横向预警限,预警限分为预警上限和预警下限,预警上限的误判率定义为10%;预警下限的误判率定为20%,预警上限和预警下限之间的构成区域为预警区。若待测样品误判率小于10%,则此样品无预警下限;若大于10%且小于20%,则此样品无预警上限;若误判率大于20%,则此方法不适用于该样品污染情况判定。红色预警限与黑色合格限呈十字交叉状,故称此图为“十字交叉图”。此交叉线将坐标平面分为X、Y、Z和W四个区域,Y区代表ATP生物发光法测试合格区,W区代表测试不合格区,而X区和Z区代表ATP生物发光法测试的误判区。X、Y、Z和W四个区域内分布的样本点数目分别记为x、y、z和w,误判率记为S,如公式1所示。

**Table 1** Sample information of *Bupleurum Bupleurum* DC.

Sample No.	Lable	Sample information
1-15	a	Anhui, store at 25 °C
16-31	b	Gansu, store at 25 °C
32-47	c	Hebei, store at 25 °C
48-61	d	Anhui, store at 4 °C
62-74	e	Gansu, store at 4 °C
75-87	f	Hebei, store at 4 °C
88-97	g	Anhui, vacuum storage at 4 °C
98-107	h	Gansu, vacuum storage at 4 °C
108-118	i	Hebei, vacuum storage at 4 °C



**Figure 2** Schematic diagram of demarcation method of warning limit of relative luminescence intensity. BI: Bioluminescence intensity; MC: Microbial content; RLU: Relative light unit

$$S = \frac{x + z}{x + y + z + w} \times 100\% \quad (1)$$

误判率 $S$ 是评估基于十字交叉法划定的生物发光强度预警限值优劣的核心指标, $S$ 值越低,表明ATP生物发光法测试结果准确度越高,越利于用于样品微生物总量快速判断。但由于样本自身复杂性和ATP生物发光法测试准确性,所以十字交叉法仅适用于误判率低于20%的样品结果分析。

**结合偏最小二乘回归模型法的柴胡样本微生物污染预测方法** 偏最小二乘回归法 (partial least squares regression, PLSR) 是一种可以用于构建数据定量分析模型的强大统计工具<sup>[19,20]</sup>。采用SIMCA软件进行PLSR建模分析,基于ATP生物发光强度测试值构建不同柴胡饮片TAMC和TYMC含量的单变量PLSR模型。模型的评价指标包括决定系数 $R^2$ ,校正集均方根误差 $RMSE_E$ 和交叉验证集均方根误差 $RMSE_{CV}$ , $R^2$ 越高, $RMSE_E$ 和 $RMSE_{CV}$ 值越低,说明所建PLSR模型的预测性能越好。

## 结果

### 1 筛选ATP生物发光法最佳检测体系

荧光检测试剂中的荧光素酶是生物发光反应的

关键催化剂,如图3A所示,当荧光检测试剂浓度为 $3\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,发光信号强度相对最高。这可能是由于当其浓度较低时,可能无法保证细菌释放的ATP被完全反应导致其发光强度明显偏低;而浓度较高时,生物发光强度也略有降低,推测荧光素酶浓度过高可能也不利于反应正向进行。因此,综合考虑检测效率,确定合适的荧光检测试剂浓度为 $3\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

震摇时间对生物发光反应的影响如图3B所示,当震摇时间为 $10\text{ s}$ 时,发光信号强度相对较高。随着震摇时间的进一步延长,发光强度出现了不同程度的下降,这可能是由于ATP生物发光反应的半衰期比较短,干扰了检测信号。因此,综合考虑检测时效,确定震摇时间为 $10\text{ s}$ 。

CTAB是一类季铵盐表面活性剂,可快速有效裂解微生物细胞。但是,CTAB本身会对荧光素酶促反应产生一定的抑制作用,因此本研究选择 $\beta\text{-CD}$ 作为CTAB的保护剂。结果如图3C、D所示,CTAB浓度在 $2.5\text{ mmol}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时对微生物细胞裂解效果最好,而 $\beta\text{-CD}$ 在 $7.5\text{ mmol}\cdot\text{mL}^{-1}$ 对CTAB包含保护作用最佳。因此确定ATP生物发光法最优检测体系为: $3\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 荧光素酶,震摇时间 $10\text{ s}$ , $2.5\text{ mmol}\cdot\text{mL}^{-1}$ CTAB和 $7.5\text{ mmol}\cdot\text{mL}^{-1}$  $\beta\text{-CD}$ 。

## 2 ATP生物发光法检测ATP标准样本和纯菌样本

基于优化后的检测体系对ATP标准样本进行检测,结果如图4A所示,ATP浓度对数值和生物发光强度呈现二次多项式关系(表2),拟合后 $R^2$ 可达 $0.996$ 。这表

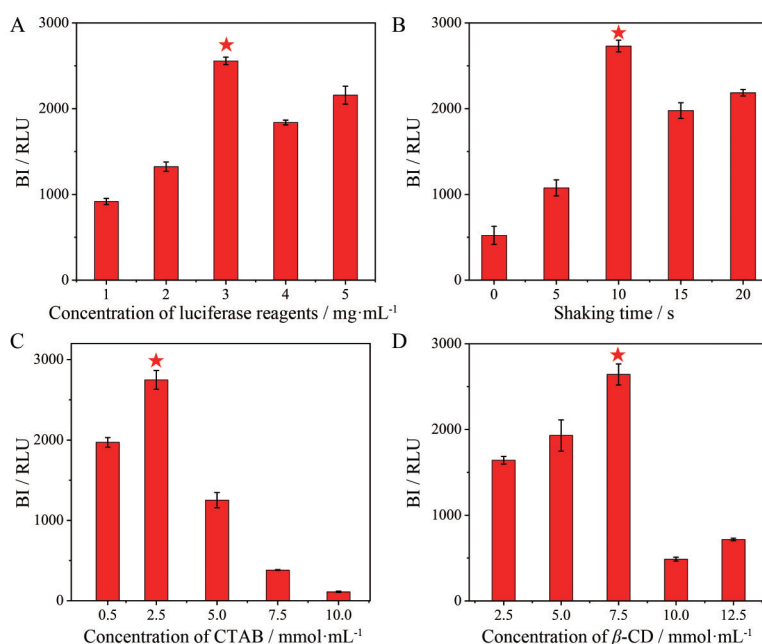
明构建的ATP生物发光检测体系可有效将ATP信号转换为荧光信号。当ATP浓度大于 $1\times 10^{-16}\text{ mol}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,检测到的生物发光强度均大于 $2\ 000\text{ RLU}$ ,证明荧光素酶对ATP具有高效催化作用。

三种细菌的ATP生物发光检测结果如图4B~D所示,可见三种细菌浓度对数值和生物发光强度均呈二次多项式函数关系(表2),同ATP实验结果较一致,并且拟合后 $R^2$ 均大于 $0.994$ 。进一步证明构建的检测体系不仅可以实现ATP标准样本检测,而且可以快速有效裂解不同类型细菌,从而快速检测细菌浓度。实验结果表明,大肠埃希菌、枯草芽孢杆菌和金葡菌的检测限分别为 $47.86$ 、 $89.13$ 和 $1\ 862.09\text{ CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,检测时间为 $6.5\text{ h}$ ,检测成本低至 $2\text{ 元/次}$ 。综上所述,本文构建的ATP生物发光检测体系可以实现ATP标准样本和纯细菌样本的高灵敏快速检测,为下一步实际中药柴胡饮片样本中的微生物快速检测奠定基础。

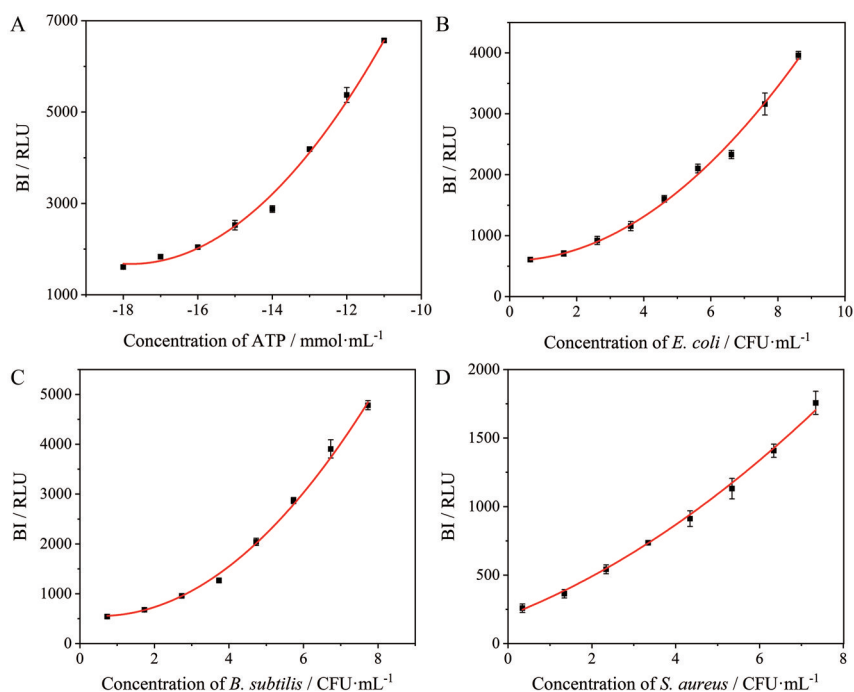
## 3 柴胡饮片前处理工艺条件考察

震摇时间是影响柴胡饮片供试液制备的关键因素,结果如图5A所示,当震摇时间大于 $30\text{ min}$ 后,TAMC和TYMC未明显增加,因此综合考虑微生物转移率和减少饮片浸出时间两个因素,确定震摇时间为 $30\text{ min}$ ,转速 $300\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ ,温度 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 。

如图5B所示,通过采集不同增菌时间点的震摇液并测试生物发光强度,可以看到由于供试液微生物扩增繁殖,导致三个不同批次柴胡样品的生物发光强度均随着增菌时间延长而增加,达到了放大信号的预期



**Figure 3** Effects of the concentration of fluorescence reagents (A), shaking time (B), concentration of CTAB (C), concentration of  $\beta\text{-CD}$  (D) on bioluminescence intensity



**Figure 4** The relationship between bioluminescence intensity and the logarithm of concentration of ATP (A), *E. coli* (B), *B. subtilis* (C), *S. aureus* (D). *E. coli*: *Escherichia coli*; *S. aureus*: *Staphylococcus aureus*; *B. subtilis*: *Bacillus subtilis*

**Table 2** Results of ATP and bacterial assays. LOD: Limit of detection;  $R^2$ : Coefficient of determination. LOD is determined by calculating the bacterial concentration of the standard solution when the value of 3 times the blank signal is produced

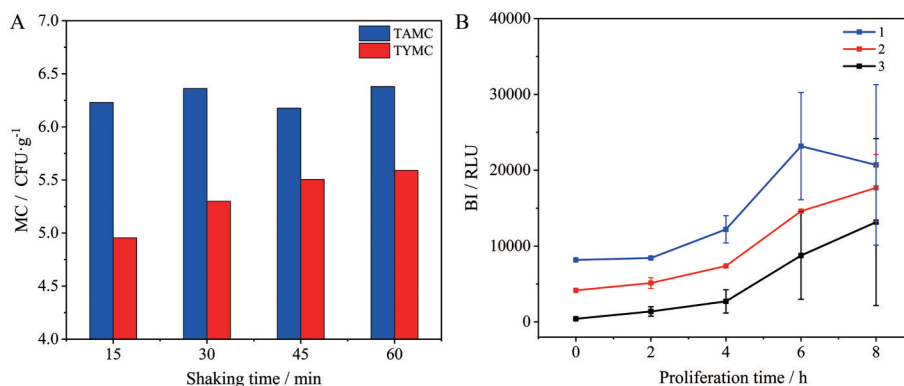
Variable	Equation	LOD /CFU·mL <sup>-1</sup>	$R^2$
ATP	$Y = 105.72X^2 + 3\ 764.73X + 35\ 189.18$	\	0.996
<i>E. coli</i>	$Y = 44.23X^2 + 4.17X + 588.17$	47.86	0.994
<i>B. subtilis</i>	$Y = 82.72X^2 - 87.61X + 576.22$	89.13	0.996
<i>S. aureus</i>	$Y = 11.57X^2 + 119.19X + 205.59$	1\ 862.09	0.996

目的。进一步观察发现,当增菌时间在4~6 h内,生物发光强度值实现了突跃,推测可能是因为样本中的大部分微生物进入对数生长期。因此,选择6 h作为增菌

时间,培养温度是37 °C,增菌培养基选用TSB。

#### 4 十字交叉法快速判断柴胡饮片微生物污染情况

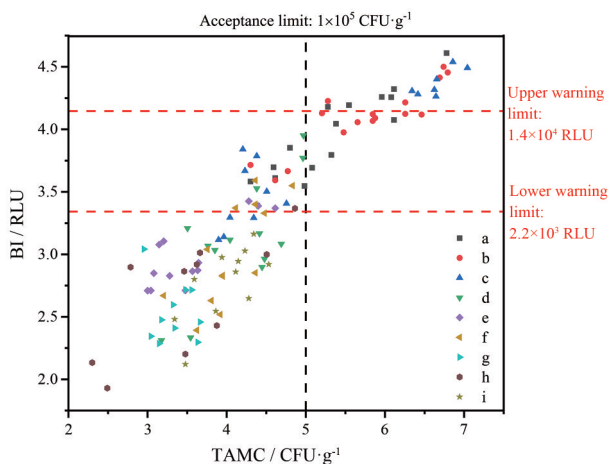
图6、7分别为118个柴胡饮片样本进行培养法计数和与ATP生物发光检测结果对比,横坐标为对应微生物总量的对数值,纵坐标为生物发光强度值的对数值。分析这两幅图可知,真空低温储藏的柴胡饮片微生物污染状况明显好于常温储藏的柴胡样本。柴胡饮片样本中TAMC分布在 $1 \times 10^2 \sim 1 \times 10^7$  CFU·g<sup>-1</sup>, TYMC分布在 $10 \sim 1 \times 10^7$  CFU·g<sup>-1</sup>。从这两幅图可知,柴胡饮片的生物发光强度值随着TAMC或TYMC含量增加而基本呈现上升趋势,这同纯细菌样本测试结果一致,进一步证明ATP生物发光法结合增菌处理在柴胡饮片样



**Figure 5** The logarithm of microbial content of *Bupleurum chinense* DC. samples under different shaking time (A) and the bioluminescence intensity of *Bupleurum chinense* DC. samples under different proliferation time (B). TAMC: Total aerobic microbial count; TYMC: Total yeast and mold count

本微生物污染程度快速判断的可行性。

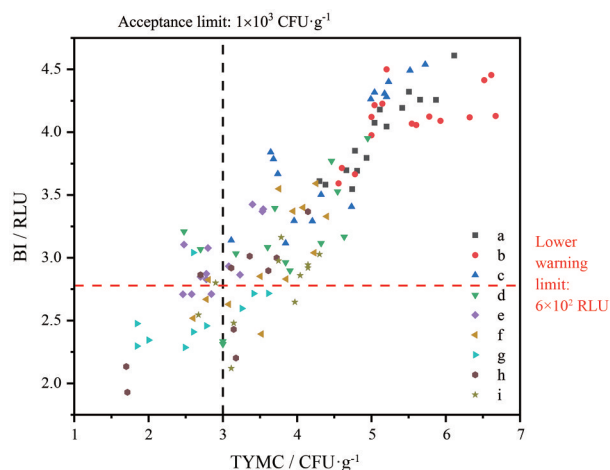
分析图 6, 根据国标规定的 TAMC 的限度  $1 \times 10^5 \text{ CFU} \cdot \text{g}^{-1}$  划定合格限, 以 10% 误判率划定预警上限为  $14\ 000 \text{ RLU}$  ( $S = \frac{12}{118} \approx 10\%$ ), 以 20% 误判率划定预警下限为  $2\ 200 \text{ RLU}$  ( $S = \frac{24}{118} \approx 20\%$ )。若样本的发光强度值高于  $2\ 200 \text{ RLU}$ , 预判 TAMC 含量超标, 可再进行国标培养法复检核; 若低于  $2\ 200 \text{ RLU}$ , 预判 TAMC 含量合格。图 6 显示的是柴胡饮片中 TYMC 总量与生物发光强度测试值的对应关系图, 以国标规定的 TYMC 的限度  $1 \times 10^3 \text{ CFU} \cdot \text{g}^{-1}$  划定合格限, 由于该检测结果误判率较高, 故无法得到预判率为 10% 的预警上限。以 20% 误判率划定预警下限约为  $600 \text{ RLU}$  ( $S = \frac{32}{118} \approx 19\%$ ), 若样本发光强度值高于  $600 \text{ RLU}$ , 则判定该柴胡样本 TYMC 含量超标; 若低于  $600 \text{ RLU}$ , 则判定 TYMC 含量合格。



**Figure 6** Scatter plot of the logarithm of TAMC and the logarithm of bioluminescence intensity of *Bupleurum chinense* DC. samples. a, b, c, d, e, f, g, h and i represent nine different sets of *Bupleurum chinense* DC samples

### 5 偏最小二乘回归模型法快速预测柴胡饮片样本微生物污染量

分别对比了 ATP 生物发光强度值和取对数后的数值对应于 TAMC 和 TYMC 含量实测值的 PLSR 模型效果, 结果见表 3。可见, 当将 ATP 生物发光强度值取对数处理后, TAMC 总数的 PLSR 模型效果有较好改善, 决定系数  $R^2$  由 0.766 提高到 0.826,  $\text{RMSE}_E$  值由 0.543 降低至 0.468,  $\text{RMSE}_{CV}$  值由 0.544 降低至 0.465, 表明模型预测效果得到了提高。同样将 ATP 生物发光强度值经取对数处理后发现, 柴胡饮片 TYMC 总量的 PLSR 定量模型的  $R^2$  由 0.576 提高到 0.778,  $\text{RMSE}_E$  值由 0.750



**Figure 7** Scatter plot of the logarithm of TYMC and the logarithm of bioluminescence intensity of *Bupleurum chinense* DC. samples. a, b, c, d, e, f, g, h and i represent nine different sets of *Bupleurum chinense* DC. samples

**Table 3** Performance evaluation of the PLSR prediction models of TAMC and TYMC. PLSR: Partial least squares regression;  $\text{RMSE}_E$ : Root mean square error of correction set;  $\text{RMSE}_{CV}$ : Root mean square error of cross verification set

Indicator	Pretreatment method	$R^2$	$\text{RMSE}_E$	$\text{RMSE}_{CV}$
TAMC	Logarithmic treatment	0.826	0.468	0.465
	Raw date	0.766	0.543	0.544
TYMC	Logarithmic treatment	0.778	0.543	0.541
	Raw date	0.576	0.750	0.750

降低到 0.543,  $\text{RMSE}_{CV}$  值由 0.750 降低到 0.541, 模型预测效果也得到了明显提高。因此, ATP 生物发光强度值经取对数简单预处理, 结合 PLSR, 可以实现对柴胡饮片 TAMC 和 TYMC 总量的快速准确定量预测。这种方法相比于十字交叉法, 可以更为准确地预判得到未知样品的对应微生物含量, 而不仅仅是一个粗泛的微生物污染范围。但是  $R^2$  值还是相对偏低, 这可能是由于两方面的原因造成的: 第一, 两种方法的检测原理不同, 培养法是通过调配微生物生长必需的营养元素制成固体培养基, 基于在其表面生长的菌落提供微生物数量和种类等信息。但是培养基配方是为了符合更广泛的微生物细胞的生长条件, 对于多数微生物种类而言, 并不是其最优生长条件, 尤其对于有活力但不可培养微生物则无法复苏, 因此, 培养法检测结果往往低于真实微生物数量。而 ATP 生物发光法基于荧光素酶促反应, 在有氧条件下, 荧光素在荧光素酶和  $\text{Mg}^{2+}$  的催化作用下特异性地和微生物体内释放的 ATP 反应并释放光子, 再转换为生物发光强度, 进而作为微生物定量检测依据。因此, 在稳定高效的 ATP 生物发光检测

体系的保障下,该方法几乎可以检测到样本中存在的所有活体微生物,包括不可培养微生物。所以ATP生物发光法的检测结果更贴近于真实污染情况。第二,样本中微生物生长状态可能存在一定的差异,这会导致细胞释放ATP的水平不完全一致,进而对ATP生物发光信号具有一定的影响,这也是造成ATP方法测试结果存在波动的一个主要原因。基于这两方面原因,使得ATP生物发光方法的检测结果与培养法结果存在一定的偏差。但是基于交叉法和PLSR,ATP生物发光法不需要经过培养即可预判得到未知样品微生物污染情况,检测时间可由数天缩短至7 h内,大为缩短了微生物检测时间,提高了微生物检测的时效性。

## 讨论

本文通过优化检测工艺,构建了最优的ATP生物发光检测体系。该检测方法可实现对ATP和大肠埃希菌、金葡菌、枯草芽孢杆菌纯菌菌液的准确检测,实现检测时间由传统培养法的5~7天大幅降低至6.5 h,检测成本低。其次,针对柴胡饮片供试液本底导致的荧光干扰现象,提出了增菌培养的前处理方法,通过信号放大策略有效削弱了本底干扰。接着,采用ATP生物发光技术巧妙结合交叉判断法可实现对柴胡饮片微生物污染总数的快速预判。同时基于ATP生物发光强度测试值和培养检测实测值,可建立柴胡饮片的TAMC和TYMC的单变量PLSR预测模型,ATP生物发光强度值经对数处理后,可大幅提高模型的预测准确性,为柴胡饮片中TAMC和TYMC的快速定量提供了一种新方法。本文提出的ATP生物发光法测试步骤简单,成本较低,提出的交叉法和PLSR模型统计方法可对未知柴胡样品中的TAMC和TYMC这两个微生物污染风险关键指标进行准确预判和定量。本论文提出的方法可以作为一种新的中药材和中药饮片微生物限度快速检测方法,为制药企业、医院和药品监管部门在现场检测时提供一种时效性更强的微生物检测技术,为中药产品微生物污染过程控制和限时放行提供一项更为便捷和灵敏的检测技术。

**作者贡献:** 张泽帅和谢茂梅负责实验研究和文章撰写;文有青和颜月玲负责数据分析;王海霞负责实验指导和文章修订;李正给予部分经费支持。

**利益冲突:** 所有作者均声明没有利益冲突。

## References

[1] Tu PF, Jiang Y, He Y, et al. Quality control and standard system construction of chinese crude drugs and its decoction pieces [J]. China Food Drug Adm Mag (中国食品药品监管), 2022, 10:

34-45.

[2] Sun Y, Xu G, Ma SC. Development of an overall evaluation system for traditional Chinese medicine [J]. Acta Pharm Sin (药理学学报), 2021, 56: 1749-1756.

[3] Huo XF, Liu WD, Liu XP, et al. Study on microbial contamination of chinese medicinal materials and Chinese medicine decoction pieces [J]. Drug Eval (药品评价), 2021, 18: 1469-1472.

[4] Zhang P, Shi CH, Hu YY, et al. Microbiological examination method of 50 kinds of chinese medicine decoction pieces and their microbial contamination [J]. China Pharm (中国药业), 2021, 30: 40-44.

[5] Zhang ZS, Xie MM, Li Z, et al. Discussion on microbial quality control strategy in whole process of Chinese materia medica production guided by concept of QbD [J]. Chine J Exp Tradit Med Form (中国实验方剂学杂志), 2023, 29: 176-184.

[6] Hu CQ. Current situation and the trend in pharmaceutical microbial control system [J]. Chin J Mod Appl Pharm (中国现代应用药学), 2021, 38: 513-519.

[7] 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 (中国药理学杂志), 2021, 56: 1671-1676.

[8] Liu TT, Ji J, Niu MM, et al. Investigation of microbial contamination in traditional Chinese medicine decoction pieces: Typhae Pollen, Bupleuri Radix and Celosiae Semen [J]. Chin Pharm Aff (中国药事), 2018, 32: 1220-1225.

[9] Chen L, Chen W, Liu ZJ, et al. Progress on contamination and identification methods of harmful microorganisms in Chinese herbal medicines [J]. Microbiol China (微生物学通报), 2022, 49: 2838-2848.

[10] National Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典) [M]. 2020 Ed. Beijing: China Medical Science and Technology Press, 2020, 155-156.

[11] Bottari B, Santarelli M, Neviani E. Determination of microbial load for different beverages and foodstuff by assessment of intracellular ATP [J]. Trends Food Sci Technol, 2015, 44: 36-48.

[12] Lee J, Park C, Kim Y, et al. Signal enhancement in ATP bioluminescence to detect bacterial pathogens via heat treatment [J]. BioChip J, 2017, 11: 287-293.

[13] Kim SU, Jo EJ, Noh Y, et al. Adenosine triphosphate bioluminescence-based bacteria detection using targeted photothermal lysis by gold nanorods [J]. Anal Chem, 2018, 90: 10171-10178.

[14] Toshihiro T, Yasukazu N, Takeshi N. Rapid single cell detection of lactic acid bacteria in the beer using bioluminescence method [J]. Biocontrol Sci, 2019, 24: 29-37.

[15] Liu RN, Sun SJ, Ge YY, et al. Validation study on amplified ATP bioluminescence assay in the detection of control bacteria-application in cosmetics field [J]. Food Ferment Ind (食品与发酵工业), 2021, 47: 252-258.

- [16] Zhai L, Ge YY, Hong HJ, et al. Feasibility study on the amplified ATP bioluminescence assay in microbial detection: a case study in cosmetics [J]. Food Ferment Ind (食品与发酵工业), 2020, 46: 201-206.
- [17] Dung TN, Hye RK, Jae HJ, et al. The development of paper discs immobilized with luciferase/*D*-luciferin for the detection of ATP from airborne bacteria [J]. Sens Actuators B Chem, 2018, 260: 271-281.
- [18] Zhai L, Ge YY, Cui SG, et al. Validation study of amplified ATP bioluminescence assay for microbial detection in cosmetics [J]. China Surfactant Deterg Cosmet (日用化学工业), 2020, 50: 771-782.
- [19] Wu SJ, Zhang ZY, Li Z, et al. Determination of the blending end-point of Qingyan tablets during the simplified simulation blending process based on near infrared spectroscopy [J]. Acta Pharm Sin (药 学 学 报), 2020, 55: 1257-1264.
- [20] Ning RX, Xiong ZW, Zhao YX, et al. Dynamic two-dimensional characterization technique and influencing factors analysis of the hygroscopicity of Chinese medicine extracts [J]. Acta Pharm Sin (药 学 学 报), 2022, 57: 1887-1894.