启脾丸微生物限度检查法的研究及微生物污染情况分析

樊兰艳，甘永琦，农　浚，谭慧敏，朱　斌*
（广西壮族自治区食品药品检验所，广西南宁 530021）

摘要：启脾丸是含药材原粉的中药制剂，易受到微生物污染。按现行标准检验了 10 家生产企业的 149 批启脾丸样品，并分析结果。随后，通过探索性研究建立启脾丸的微生物限度检查方法，并采用基质辅助激光解析电离 - 飞行时间质谱（MALDI-TOF-MS）或 16S rRNA 基因测序技术鉴定检出的微生物，分析其微生物污染状况。结果显示，149 批样品微生物限度检查结果均符合规定。建立的启脾丸微生物限度检查法为需氧菌总数 1 ∶ 20 平皿法、霉菌和酵母菌总数计数 1 ∶ 10 平皿法，控制菌大肠埃希菌、耐胆盐革兰阴性菌、沙门菌均采用常规法；污染菌鉴定结果中，90%为芽孢杆菌属，提示各生产企业仍需加强微生物的过程控制。

关键词：启脾丸；微生物限度检查；方法适用性；污染菌；分离；鉴定
中图分类号：R286　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1001-8255(2023)11-1646-06
DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2023.11.014

Microbial Limit Test of *Qipi* Pills and Analysis of Microbial Contamination

FAN Lanyan, GAN Yongqi, NONG Jun, TAN Huimin, ZHU Bin*
(*Guangxi Institute for Food and Drug Control, Nanning 530021*)

ABSTRACT: *Qipi* pills, a traditional Chinese medicine formulation composed of raw medicinal herb powder, are highly susceptible to microbial contamination. In this study, 149 batches of samples from 10 different manufacturers were tested in accordance with current standards and the results were analyzed. Subsequently, exploratory research was conducted to establish a microbial limit detection method for *Qipi* pills. The detected microorganisms were identified using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) or 16S rRNA gene sequencing technology, and their microbial contamination status was assessed. The results revealed that all 149 batches of samples complied with the regulations upon microbial limit inspection. The established microbial limit inspection method for *Qipi* pills was 1∶20 for total aerobic bacteria count, 1∶10 for total mold and yeast count, while standard methods were employed for specified microorganisms including *Escherichia coli*, bile salt-tolerant Gram-negative bacteria, and *Salmonella*. Among the identified contaminating bacteria, 90% were *Bacillus* spp., suggesting an enhancement in process control over microorganisms by manufacturers was necessary.

Key Words: *Qipi* pill; microbial limit test; method applicability; contaminated bacteria; isolation; identification

药品微生物控制是药品安全性保障的重要措施[1]。含药材原粉的中药制剂由于原料来源广泛、炮制工艺特殊、处方中多有以原粉形式直接入药的药味等原因，非常容易受到微生物污染[2]。中药制剂如果受到微生物污染，将直接影响药品的质量，进而可能在使用过程中导致用药者出现不良反应。因此，开展药品微生物限度检查，明确药品污染与否或污染程度，有助于控制药品的质量、保证用药的有效性和安全性。

启脾丸是由人参、麸炒白术、茯苓、甘草、陈皮、山药、莲子（炒）、炒山楂、六神曲（炒）、炒麦

收稿日期：2023-05-09
作者简介：樊兰艳(1986—)，女，硕士，从事药品、化妆品等微生物学检验研究。
通信作者：朱　斌(1968—)，女，硕士，主任药师，从事微生物检验研究。
E-mail：Zhubin1226@sina.com

芽、泽泻等十一味药材细粉加炼蜜混合制成的含神曲发酵原粉的中药口服制剂，具有健脾和胃的功能。本研究对全国 11 家生产企业共 149 批国家评价性抽验的启脾丸样品进行检验，通过探索性研究建立启脾丸微生物限度检验方法，并对检出菌进行分离鉴定，以期为该产品生产过程中的微生物污染控制、质量提高提供参考。

1 仪器与试药

PGC1502e 型电子天平（英国艾德姆公司，0.01 ～ 1 500 g）；VITEK® 2 COMPACT 型全自动微生物鉴定仪（生物梅里埃中国有限公司）；Microflex LT/SH 型飞行时间质谱仪（德国 Bruker 公司）；MLR-351H 型培养箱（日本三洋公司）；BD（E2）240 型培养箱、BD400 型培养箱（德国宾德公司）；AC2-6S1 型生物安全柜（新加坡益思科生物公司）；GR110DR 型高压灭菌锅［致微（厦门）仪器有限公司］；DM600 型显微镜（德国莱卡公司）。

启脾丸来源于 T、H、L、N、J、TY、S、B、BJ、Y 等 10 家生产企业，共 149 批样品；其中 T 16 批次、H 10 批次、L 2 批次、N 22 批次、J 4 批次、TY 2 批次、S 4 批次、B 2 批次、BJ 54 批次、Y 33 批次。胰酪大豆胨琼脂培养基（TSA，批号 VM755858）、胰酪大豆胨液体培养基（TSB，批号 VM785759）均购自默克密理博公司；沙氏葡萄糖琼脂培养基（SDA，批号 1071195）、麦康凯琼脂培养基（MCA，批号 3303011）、肠道增菌液体培养基（EE，批号 3303051）、紫红胆盐葡萄糖琼脂培养基（VRBGA，批号 3304009）、RV 沙门菌增菌液体培养基（RV，批号 3302101）、4- 甲基伞形酮葡糖苷酸（MUG）培养基（批号 3105178）均购自广东环凯生物科技有限公司；麦康凯液体培养基（MCB，批号 171127）、木糖赖氨酸脱氧胆盐培养基（XLD，批号 150916）均购自北京陆桥技术股份有限公司。其中，MCA 和 XLD 配制方式为加热溶解倒板，其余培养基均按照配制说明使用。所用培养基的适用性和灵敏度检查结果均符合要求。

枯草芽孢杆菌［CMCC（B）63501］、金黄色葡萄球菌［CMCC（B）26003］、铜绿假单胞菌［CMCC（B）10104］、大肠埃希菌［CMCC（B）44102］、沙门菌［CMCC（B）10104］、白色念珠菌［CMCC（F）98001］、黑曲霉［CMCC（F）98003］均由中国医学细菌菌种保藏管理中心提供。

2 方法与结果

2.1 样品微生物限度检查情况

根据企业提供的方法和《中华人民共和国药典》2015 年版（ChP 2015）对 149 批样品进行检验，需氧菌总数、霉菌和酵母菌总数均符合规定；控制菌方面，149 批样品中均未检出大肠埃希菌（1 g）、沙门菌（10 g），耐胆盐革兰阴性菌均 <10 cfu/g，少部分样品在 MCA 平板和 XLD 平板上长出菌落，经鉴定均不是目标控制菌。在 149 批样品中，霉菌和酵母菌总数均 <10 cfu/g；需氧菌总数 <10 cfu/g 的共有 30 批（占检品总数的 20%），10 ～ 100 cfu/g 的有 75 批（占检品总数的 50%），100 ～ 500 cfu/g 的有 44 批（占检品总数的 30%）。需氧菌总数最高为 500 cfu/g，均远低于产品需氧菌的限度标准 10^5 cfu/g，说明产品满足微生物限度要求。

各企业样品抽检数量及需氧菌总数结果如图 1 所示。抽检最多的 BJ 企业，需氧菌总数多为 10 ～ 100 cfu/g，共有 45 批；其次 Y 企业，共抽检 33 批，需氧菌总数集中在 100 ～ 500 cfu/g，共 28 批。

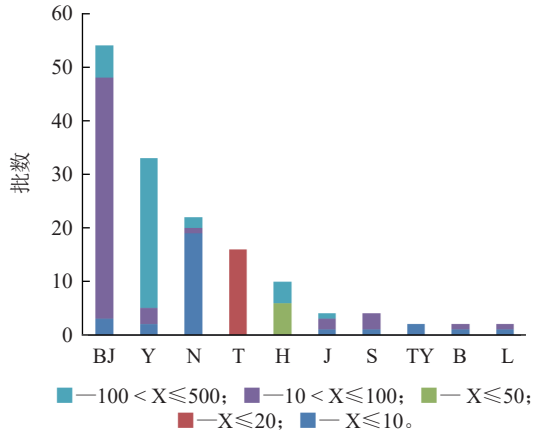


图 1 不同企业样品中需氧菌总数的检验结果

Fig.1 Test Results of Total Aerobic Bacterial Counts in Samples from Different Enterprises

2.2 启脾丸微生物限度检查法的建立

2.2.1 需氧菌总数计数方法的建立

菌液制备：菌液参考 ChP 2015 年版四部通则

1105 制备。

供试液制备：分别从 10 家不同生产企业选取 1 批样品，用 TSB 制备成 1 ∶ 10、1 ∶ 20 的供试液。

试验组需氧菌总数测试：分别取 1 ∶ 10、1 ∶ 20 的供试液 9.9 mL，加入各试验菌液 0.1 mL，充分混匀后按平皿法（每皿 1 mL）测定。

试验组霉菌和酵母菌总数测试：取 1 ∶ 10 的供试液 9.9 mL，加入试验菌液 0.1 mL，充分混匀后按平皿法（每皿 1 mL）测定。

取稀释液替代供试液，同试验组操作，作为菌液对照组。取制备好的供试液，以稀释液代替菌液同试验组操作，作为供试品对照组。

各试验菌回收比值要求为 0.5 ～ 2。试验结果如表 1、2 所示。

表 1　启脾丸预试验回收比值

Tab.1　Pre-test Recovery Ratios of *Qipi* Pills

样品来源	需氧菌总数(枯草芽孢杆菌)回收比值		霉菌和酵母菌总数(白色念珠菌)回收比值
	1∶10	1∶20	1∶10
T	0.51	—	0.60
H	0.84	—	0.96
L	0.90	—	0.79
S	0.68	—	0.95
B	0.54	—	0.87
J	0.78	—	0.83
BJ	0.68	—	0.96
Y	0.26	0.54	1.00
TY	0.84	—	0.87
N	0.88	—	0.85

注：“—”表示未进行相关试验。

结果显示，只有 Y 企业需氧菌总数采用 1 ∶ 10 的供试液平皿法（每皿 1 mL）时，枯草芽孢杆菌的回收比值为 0.26，不符合要求，抑菌活性尚未有效消除；而当采用 1 ∶ 20 供试液的平皿法（每皿 1 mL）时，枯草芽孢杆菌的回收比值为 0.54，符合药典要求。因此，启脾丸样品需氧菌总数计数拟采用 1 ∶ 20 的供试液平皿法；霉菌和酵母菌总数计数拟采用 1 ∶ 10 供试液平皿法。

按照预试验拟采用的方法，对 10 批样品进行 5 种试验菌的加菌回收试验，结果如表 2 所示，5 种试验菌回收比值均为 0.5 ～ 2，符合药典要求。部分样品可能由于原辅料来源不同，导致样品的抑菌性存在差异，枯草芽孢杆菌的回收比值在 0.5 左右，但也符合要求，因此为了建立统一的方法，保证低稀释级能检出更多污染菌，启脾丸样品需氧菌总数计数采用 1 ∶ 20 供试液、霉菌和酵母菌总数采用 1 ∶ 10 的供试液平皿法是可行的。

2.2.2　控制菌方法适用性试验

照 ChP 2015 年版通则 1106 进行启脾丸控制菌方法的适用性试验。其中，检测大肠埃希菌时，取规定量的供试液接种至 TSB 100 mL 中；检测耐胆盐革兰阴性菌时，取规定量的供试液接种至 EE 10 mL 中；检测沙门菌时，取供试品 10 g 接种至 TSB 200 mL 中。并同步进行阴性、阳性对照和供试品检查。结果如表 3、4、5 所示。

表 2　10 批样品 5 种试验菌的回收比值

Tab.2　Recovery Ratios of Five Test Bacteria Ten 10 Batches of Samples

样品来源	回收比值				
	金黄色葡萄球菌	铜绿假单胞菌	枯草芽孢杆菌	白色念珠菌[1)]	黑曲霉[1)]
T	1.02	0.90	0.52	0.59/0.94	1.10/1.00
H	0.95	0.54	0.53	0.67/0.79	1.35/0.91
L	0.67	0.60	1.09	0.79/1.11	0.79/1.01
S	0.78	0.55	0.62	0.87/0.80	0.89/1.00
B	0.76	0.67	0.62	0.79/0.75	0.89/0.92
J	0.92	0.74	0.53	0.87/1.13	0.97/0.83
BJ	0.78	0.71	0.73	0.65/0.87	0.75/0.81
Y	0.94	0.89	0.76	0.75/0.94	0.94/1.01
TY	1.08	0.58	0.84	0.87/0.80	0.84/0.92
N	0.82	0.67	0.69	0.85/0.78	0.88/0.86

注：[1)] 表示所得的数据为 TSA/SDA 培养基上的回收比值。

表 3 大肠埃希菌的方法适用性试验结果

Tab.3 Applicability Test Results of *Escherichia coli* Method

组别	培养基			大肠埃希菌鉴定结果	
	TSB	MCB	MCA	MUG	靛基质
试验组	浑浊	浑浊	桃红色菌落	+	+
供试品组	浑浊	澄清	无菌生长	-	-
阳性对照组	浑浊	浑浊	桃红色菌落	+	+
阴性对照组	澄清	澄清	无菌生长	-	-

注：“+”表示阳性反应；“-”表示阴性反应，下同。

结果显示，按照上述方法进行启脾丸控制菌检查方法的适用性试验，取规定量的供试品接种至适宜体积的培养基，均能检出所加的阳性菌，方法可行。

2.3 启脾丸污染菌分离鉴定

对 149 批启脾丸样品进行微生物限度检查，挑取胰酪大豆胨琼脂培养基、沙氏葡萄糖琼脂培养基计数平板以及控制菌分离平板上的代表菌落，分离培养，使用 MALDI-TOF-MS 或 16S rRNA 基因测序技术鉴定，并结合菌落形态、革兰染色，必要时通过全自动微生物鉴定及药敏分析系统鉴定，最终确认鉴定结果。

按照上述污染菌分离鉴定程序，共分离鉴定 494 株菌，包含 493 株细菌和 1 株真菌。其中，493 株细菌中，鉴定为芽孢杆菌属（*Bacillus*）的有 449 株，占总数的 91.1%；类芽孢杆菌属（*Paenibacillus*）、枝芽孢杆菌属（*Virgibacillus*）、空气芽孢杆菌属（*Aeribacillus*）等共有 37 株，占总数的 7.5%；其余的欧文菌属（*Erwinia*）、不动杆菌属（*Acinetobacter*）、泛菌属（*Pantoea*）等菌属共 7 株，占鉴定总数的 1.4%。这些菌属主要来源于 MCB 培养基和 XLD 培养基这 2 种选择性分离平板。1 株真菌鉴定为灰绿曲霉（*Aspergillus glaucus*）。综上所述，启脾丸易污染菌株为芽孢杆菌属。

将鉴定结果汇总（表格于编辑部保存），共分离到枯草芽孢杆菌（*Bacillus subtilis*）、莫哈韦芽孢杆菌（*Bacillus mojavensis*）、巨大芽孢杆菌（*Bacillus megaterium*）等 55 种细菌，其中芽孢杆菌 35 种，类芽孢杆菌 16 种，欧文菌属等革兰阴性菌 4 种，真菌 1 种。

部分企业不同批号样品检出蜡样芽孢杆菌（*Bacillus cereus*），使用 MALDI-TOF 的 Biotyper 3 软件进行 MSP 聚类分析。结果显示，不同批次的样品中检出的菌株间，蛋白质图谱差异性水平 <50，差异较小（图 2），说明样品中检出的菌株很可能是来自同一污染源。由于样品从不同地方抽取，检验中未发现包装损坏，推测可能是在生产中由于某个环节控制不到位导致样品污染，或可能来自同一中

表 4 耐胆盐革兰阴性菌的方法适用性试验结果

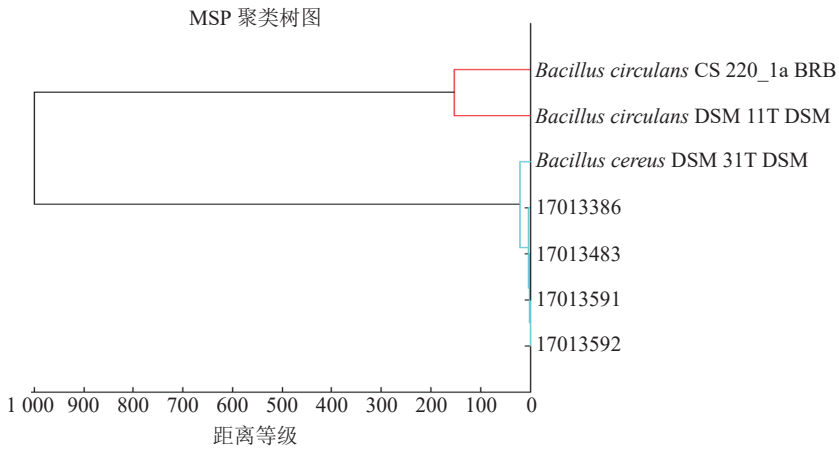
Tab.4 Applicability Test Results of Bile Salt-tolerant Gram-Negative Bacteria Method

组别	培养基				大肠埃希菌鉴定结果		铜绿假单胞菌鉴定结果
	EE			VRBGA	MUG	靛基质	氧化酶
	0.1 g	0.01 g	0.001 g				
试验组	浑浊	浑浊	浑浊	桃红色、紫红色菌落	+	+	+
供试品组	浑浊	微浑浊	微浑浊	无菌生长	-	-	-
阳性对照组	浑浊	浑浊	浑浊	桃红色、紫红色菌落	+	+	+
阴性对照组	澄清	澄清	澄清	无菌生长	-	-	-

表 5 沙门菌方法的适用性试验结果

Tab.5 Applicability Test Results of *Salmonella* Method

组别	培养基			沙门菌鉴定结果
	TSB	RV	XLD	三糖铁琼脂培养基
试验组	浑浊	浑浊	中心带黑色菌落生长	斜面产碱、底层产酸、产H_2S
供试品组	浑浊	澄清	无菌生长	未产酸、未产碱、未产H_2S
阳性对照组	浑浊	浑浊	中心带黑色菌落生长	斜面产碱、底层产酸、产H_2S
阴性对照组	澄清	澄清	无菌生长	未产酸、未产碱、未产H_2S



17013386、17013483、17013591、17013592 均为样品批号。

图 2　同一企业不同批次样品检出的蜡样芽孢杆菌聚类分析图

Fig.2　Cluster Analysis of *Bacillus cereus* Detected in Different Batches of Samples from Same Enterprise

药材原料。

3　讨论

启脾丸部分原料以原生药粉直接入药，因其具有特殊的营养易受微生物污染。按照现行标准检验了 149 批样品，微生物限度检查结果均符合标准规定，合格率为 100%，总体结果满意。各生产企业微生物污染程度均不相同，可能与人员操作或中药材的处理等因素相关。值得注意的是，Y 企业样品不同批次、相同批次均检出污染菌，存在不同程度的污染。由于样品是从 13 个不同省份、自治区、直辖市抽检，分离的污染菌多为芽孢杆菌属，无地域性差异，且检验过程包装完好，因此污染菌的来源与样品流通环节的贮存条件无关，分析污染的原因可能是由于原材料的污染或生产过程的污染，企业应加强各环节的过程控制，避免微生物的污染。

随后，通过探索性研究试验建立了启脾丸微生物限度检查方法。10 家生产企业提供的启脾丸微生物限度检查方法不一致，抑菌性有差别，可能由于原材料来源不同造成差异。经探索性研究试验，建立的微生物限度检查法符合药典要求。通过方法验证试验，可以消除药物的抑菌性，使得检验结果更具科学性和可靠性[3—4]。

此外，药品微生物学的质量，不仅包括微生物限度检查结果，还应对产品污染菌进行分析[5—7]。启脾丸原料成分多、污染的来源也较多，菌株鉴定结果显示，启脾丸中绝大部分的污染微生物为芽孢杆菌属和类芽孢杆菌属，属于条件致病菌；部分样品还检出了蜡样芽孢杆菌、鲍氏不动杆菌，均属于《卫生部人间传染的病原微生物名录》[8] 中的第三类危害病原微生物，提示了微生物污染的风险。其中，蜡样芽孢杆菌虽然不属于药典规定的控制菌，但属于食源性致病菌，由蜡样芽孢杆菌引起的食物中毒事件时有发生，可引起呕吐和腹泻综合征[9]，还可引发败血症、心内膜炎、脑膜炎等[10—11]；鲍氏不动杆菌是传播能力强的一种条件致病菌，广泛存在于自然界，是院内感染的一类重要病原菌[12]，主要感染免疫力低下人群，易形成细菌生物膜抵御恶劣环境呈优势生长，从而成为病原菌，且对宿主侵染能力强、可产生多重耐药[13—14]，已被认为是“21 世纪革兰阴性杆菌中的 MRSA（耐甲氧西林金黄色葡萄球菌）”[15]。顾珉等[16] 对儿童用药制剂检出的鲍曼不动杆菌进行风险评估，认为药品对儿童感染鲍曼不动杆菌的风险无法排除。若用药对象是婴幼儿、衰弱患者或免疫力低下的人群，可能就较易造成感染，需要严格控制微生物的污染。因此，生产企业不仅需要从源头控制，减少微生物污染，在

生产过程中还需要严格按照生产管理规范和工艺流程，加强人员、环境等环节的微生物过程监控，从而提高产品的质量。

参考文献：

[1] 胡昌勤. 药品微生物控制体系建设现状与展望[J]. 中国现代应用药学, 2021, **38**(5): 513-519.

[2] 赵高潮, 张晓辉, 刘继宁. 中药制剂微生物污染的因素及对策[J]. 陕西中医, 2004, (1): 68-69.

[3] 陈志禹, 夏 佳, 席时东. 八珍系列制剂微生物限度检查法的建立及检验结果分析[J]. 药物分析杂志, 2016, **36**(4): 739-747.

[4] 李趣嫦, 曾 璞, 肖建光, 等. 50种中成药微生物限度检查法的适用性试验及结果分析[J]. 药物分析杂志, 2017, **37**(12): 2214-2223.

[5] 王似锦, 刘文杰, 牛振东, 等. 参苓白术丸微生物学质量分析与评价[J]. 药物分析杂志, 2013, **33**(4): 673-677.

[6] 刘广桢, 胡文红, 徐晓洁, 等. 复方黄连素片微生物限度检查法的建立及检验结果分析[J]. 药物分析杂志, 2014, **34**(1): 64-70.

[7] 陈志禹, 席时东, 吴海雯. 川芎茶调丸微生物学质量分析与评价[J]. 药物分析杂志, 2016, **36**(10): 1810-1815.

[8] 国家卫生健康委员会. 卫生部关于印发《人间传染的病原微生物名录》(卫科教发[2006]15号)的通知[EB/OL]. [2023-03-24]. http://www.nhc.gov.cn/jkj/s7914/200804/de764f35fd1b4fd4b4bffacb0e1f8333.shtml.

[9] DIETRICH R, JESSBERGERN, EHLING-SCHULZ M, *et al*. The food poisoning toxins of *Bacillus cereus* [J]. *Toxins* (Basel), 2021, **13**(2): 98.

[10] BOTTONE E J. *Bacillus cereus*, a volatile human pathogen [J]. *Clin Microbiol Rev*, 2010, **23**(2): 382-398.

[11] ENOSI TUIPULOTU D, MATHUR A, NGO C, *et al*. *Bacillus cereus*: epidemiology, virulence factors, and host-pathogen interactions [J]. *Trends in Microbiol*, 2021, **29**(5): 458-471.

[12] 谷 佳, 邓水香, 倪 洁, 等. 血流感染鲍氏不动杆菌生物膜形成能力和相关基因分布及耐药性[J]. 中华医院感染学杂志, 2021, **31**(17): 2663-2667.

[13] LYNCH J P 3rd, ZHANEL G G, CLARK N M. Infections due to *Acinetobacter baumannii* in the ICU: treatment options [J]. *Semin Respir Crit Care Med*, 2017, **38**(3): 311-325.

[14] 陈金莲, 刘泉波. 某儿童医院鲍曼不动杆菌的临床来源特点及耐药性分析[J]. 中国抗生素杂志, 2023, **48**(5): 573-578.

[15] 周秀珍, 刘建华, 王艳玲, 等. 鲍曼不动杆菌连续12年的感染分布及耐药性动态变迁[J]. 中国临床药理学杂志, 2011, **27**(10): 755-758.

[16] 顾 珉, 沈海英, 顾炳仁, 等. 药品抽验中检出鲍曼不动杆菌案例的风险评估回顾和策略探讨[J]. 中国药品标准, 2020, **21**(6): 487-493.