

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2022.12.024

乙肝扶正胶囊微生物限度计数法的建立及微生物鉴定

姬俊¹, 王立云¹, 牛萌萌¹, 朱世真¹, 王尊文^{2△}

(1. 山东省青岛市食品药品检验研究院·海洋中药质量研究与评价重点实验室, 山东 青岛 266073; 2. 山东省青岛市妇女儿童医院, 山东 青岛 266034)

摘要:目的 建立乙肝扶正胶囊的微生物限度计数方法,并对检出的微生物进行鉴定。方法 按2020年版《中国药典(四部)》微生物计数法,对4家生产企业84件11批次样品进行需氧菌总数、霉菌和酵母菌总数检查;采用革兰染色镜检结合16SrDNA测序、核糖体鉴定、特异性引物聚合酶链式反应(PCR)技术鉴定污染菌。结果 4家生产企业84件11批次的乙肝扶正胶囊微生物计数检查结果均符合规定,共检出11种污染菌,其中7种为巨大芽孢杆菌,2种为枯草芽孢杆菌,2种为短小芽孢杆菌,均为非致病菌。结论 所建立的方法,可用于乙肝扶正胶囊微生物限度计数检查,分析污染微生物的来源,可为该制剂或相关中成药的质量控制和风险评估提供参考。

关键词:乙肝扶正胶囊;微生物限度;污染菌;鉴定

中图分类号:R927;R286

文献标志码:A

文章编号:1006-4931(2022)12-0097-05

Establishment of Microbial Enumeration Tests and Microorganism Identification of Yiganfuzheng Capsules

Ji Jun¹, Wang Liyun¹, Niu Mengmeng¹, Zhu Shizhen¹, Wang Zunwen²

(1. Qingdao Institute for Food and Drug Control · NMPA Key Laboratory for Quality Research and Evaluation of Traditional Chinese Medicine, Qingdao, Shandong, China 266073; 2. Qingdao Women and Children's Hospital, Qingdao, Shandong, China 266034)

Abstract: Objective To establish the microbial enumeration tests of Yiganfuzheng Capsules. **Methods** The total number of aerobic bacteria, molds and yeasts in 84 samples of 11 batches from four manufacturers were detected according to the microbial

第一作者:姬俊,女,硕士研究生,主管药师,研究方向为微生物检验,(电子信箱)jjunfirst@163.com。

△通信作者:王尊文,男,硕士研究生,副主任药师,研究方向为医院制剂,(电子信箱)xiaolinw118@163.com。

方式控制生产中的细菌内毒素,而控制泊沙康唑原料内毒素含量,有利于制剂生产工艺和质量的过程控制。

由于泊沙康唑不溶于水,本研究中考察了采用N,N-二甲基甲酰胺溶解泊沙康唑原料药后,用BET用水稀释至一定质量浓度,以建立细菌内毒素检查法。进行浓度预干扰试验时,发现0.5%~2%N,N-二甲基甲酰胺对细菌内毒素检查无干扰。同时考察了供试品的N,N-二甲基甲酰胺溶液中添加细菌内毒素的回收验证试验,确认用N,N-二甲基甲酰胺溶解供试品,对供试品的细菌内毒素检查无干扰作用。根据验证结果,重新进行了泊沙康唑的预干扰试验和正式干扰试验,并对供试品进行了细菌内毒素检查。

本研究结果表明,泊沙康唑宜先用2%的N,N-二甲基甲酰胺溶解,再用BET用水制备质量浓度≤0.833 mg/mL的供试品溶液,最后依照2020年版《中国药典(四部)》通则1143方法进行细菌内毒素检查。

综上所述,本研究建立的细菌内毒素检查方法可行,可用于制剂生产中泊沙康唑原料药细菌内毒素的控制。

参考文献

[1] 杨祥龙,李金凤,邵伟,等.泊沙康唑合成工艺研究进展[J].化工时刊,2019,33(11):22-37.

- [2] 马仕洪,肖璜,袁宇,等.泊沙康唑注射液无菌检查方法的建立[J].药物分析杂志,2018,38(9):1568-1572.
- [3] 李念夷,王小钦.泊沙康唑预防和治疗侵袭性真菌感染的进展[J].中国新药杂志,2014,23(23):2739-2757.
- [4] 罗婷,李书渊.阿加曲班细菌内毒素检查法研究[J].北方药学,2016,13(10):9-11.
- [5] 王益民,范蕾.地塞米松磷酸钠原料药细菌内毒素检查法的建立[J].中国药师,2013,16(1):148-149.
- [6] 周继春.长春西汀原料药细菌内毒素检查法研究[J].中国药房,2015,26(21):2999-3000.
- [7] 贾首前,呼延婷婷,焦洁,等.依达拉奉细菌内毒素检查法的研究[J].中国药品标准,2019,20(3):251-254.
- [8] 杨晨,谢益晖,王贺,等.磷酸左奥硝唑酯二钠细菌内毒素检测方法验证[J].中国药事,2019,33(8):944-948.
- [9] 唐先明,刘景波,宋丽阳,等.注射用盐酸艾司洛尔细菌内毒素检查法研究[J].中国药品标准,2019,20(3):255-258.
- [10] 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,2020:178-181,515-516.
- [11] 中国食品药品检定研究院.中国药品检验标准操作规范[M].北京:中国医药科技出版社,2017:484-493.
- [12] 国家药典委员会.中国药典分析检测技术指南[M].北京:中国医药科技出版社,2017:614-620.

(收稿日期:2021-11-08;修回日期:2021-12-26)

enumeration tests in the *Chinese Pharmacopoeia* (2020 Edition, Volume IV). The identification of contaminant microorganisms was detected by Gram staining microscopy combined with 16SrDNA gene sequencing, RiboPrinter ribosome identification and polymerase chain reaction (PCR) with specific primers. **Results** The results of microbial enumeration tests of 11 batches (including 84 pieces) of Yiganfuzheng Capsules from four manufacturers were in line with the test requirements. Eleven kinds of contaminant microorganisms were detected, including seven kinds of *Bacillus megaterium*, two kinds of *Bacillus subtilis* and two kinds of *Bacillus pumilus*, all of which were non-pathogenic bacteria. **Conclusion** The established method can be used for microbial enumeration tests of Yiganfuzheng Capsules to analyze the source of contaminant microorganisms, and can provide a reference for the quality control and risk assessment of the preparation or related Chinese patent medicines.

Key words: Yiganfuzheng Capsules; microbial limit; contaminant microorganisms; identification

乙肝扶正胶囊由何首乌、虎杖、贯众、肉桂等11味中药组方,临床用于治疗乙型肝炎。现行标准收录于《卫生部药品标准·中药成方制剂(第一册)》,目前国内有109家医药生产企业持有该药的批准文号。含药材原粉的中药制剂因处方中多有以原粉形式直接入药的药味,可能存在微生物污染等问题^[1-2],若为致病菌污染,则药品存在较大安全隐患,乙肝扶正胶囊处方中当归、肉桂、丹参等中药均为原粉入药。故本研究中参考2020年版《中国药典(四部)》通则1105方法对乙肝扶正胶囊进行微生物限度计数方法研究,并按适用性试验建立的方法对4家医药生产企业84件共计11个批号的产品进行微生物限度检查。检出的污染微生物依据2020年版《中国药典(四部)》通则9204“微生物鉴定指导原则”,采用16SrDNA测序、核糖体鉴定和特异性引物聚合酶链式反应(PCR)等方法进行鉴定,分析污染微生物对该制剂质量的影响程度。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 仪器、试剂与菌种

仪器:INE500型电热恒温培养箱(德国Memmert公司);ARKTIK型PCR仪(美国Thermo Fisher Scientific公司);电泳仪、电泳槽(北京六一仪器厂);化学发光成像仪(法国Vilber Lourmat公司);RiboPrinter®全自动微生物指纹分型系统(美国Dupond公司);BX53型显微镜(日本Olympus公司)。

试剂:乙肝扶正胶囊(企业A,批号分别为160201,170601,170602,170901;企业B,批号分别为20170601,20180101;企业C,批号分别为20160301,20160302,20170501;企业D,批号分别为170201,171102);细菌基因组DNA提取试剂盒、2×Pfu PCR预混试剂(北京天根生化科技有限公司);GelGreen Nucleic Acid Stain(美国Biotium公司);50×TAE缓冲液(北京酷来博科技有限公司);革兰染色液试剂盒(青岛高科园海博生物技术有限公司);胰酪大豆胨琼脂培养基(批号为3105660)、胰酪大豆胨液体培养基(批号为3105589)、沙氏葡萄糖琼脂培养基(批号为3104045),均购自广东环凯生物科技有限公司。

菌种:金黄色葡萄球菌[*Staphylococcus aureus*, CMCC(B)26003]、铜绿假单胞菌[*Pseudomonas aeruginosa*, CMCC(B)10104]、枯草芽孢杆菌[*Bacillus subtilis*, CMCC(B)63501]、白色念珠菌[*Candida albicans*, CMCC(F)98001]、黑曲霉[*Aspergillus niger*, CMCC(F)98003],均购自中国食品药品检定研究院。

1.2 方法

1.2.1 菌液制备

按2020年版《中国药典(四部)》通则及有关文献^[3]方法制备菌液。

1.2.2 计数方法适用性试验

采用2020年版《中国药典(四部)》通则1105“非无菌产品微生物限度检查:微生物计数法”。取样品10g,加胰酪大豆胨液体培养基稀释至100mL,制成1:10(m/V)供试液,再用胰酪大豆胨液体培养基稀释成1:100(m/V)供试液。试验分为试验组、菌液对照组、供试品对照组。试验组,取不同稀释度的供试液,每份9.9mL,移至无菌试管中,分别加入1.2.1项下菌液0.1mL制成供试液与菌液混合物,混匀,使每份供试液中的菌含量不超过100cfu/mL;取1mL,注入平皿中,平行制备2个平皿,分别倾注熔化的胰酪大豆胨琼脂培养基或沙氏葡萄糖琼脂培养基。菌液对照组,以胰酪大豆胨液体培养基代替供试液,其余均按试验组项下方法操作。供试品对照组,以胰酪大豆胨液体培养基代替菌液,其余均按试验组项下方法操作。将3个组的平皿置32.5℃培养箱中培养,逐日计数。微生物计数回收比值=(试验组菌落数-供试品对照组菌落数)/菌液对照组菌落数,应在0.5~2范围内。

1.2.3 污染菌分离和革兰染色镜检

从1.2.2项下检出菌的供试品平皿上,挑取11种污染菌的菌落,划线接种于TSA平皿,置32.5℃培养箱中培养24h。对纯化菌进行革兰染色,显微镜下观察。

1.2.4 微生物污染情况分析

采用PCR法。取1.2.3项下11种污染菌,提取其DNA,并以总DNA为模板,分别进行16SrDNA和巨大芽孢杆菌DNA的PCR扩增。16SrDNA的引物为,27F:5'-

AGAGTTTGATCCTGGCTCAG - 3', 1492R: 5' - TACG-GCTACCTTGTTACGACTT - 3'; 巨大芽孢杆菌的引物为, BML257: 5' - TGATGATAATCGGGA ACT - 3', BMR700: 5' - TGAATGATGCTCGTAATG - 3'^[4]。16SrDNA的PCR反应体系为, 模板1 μL, 引物各1 μL, 2 × Pfu PCR预混试剂10 μL, ddH₂O 7 μL; 巨大芽孢杆菌的PCR反应体系为: 模板2 μL, 引物各1 μL, 2 × Pfu PCR预混试剂10 μL, ddH₂O 6 μL。16SrDNA的PCR扩增条件为, 94 °C 4 min; 94 °C 45 s, 55 °C 45 s, 72 °C 1 min, 30个循环; 4 °C 10 min。巨大芽孢杆菌的扩增条件为, 94 °C 3 min, 94 °C 40 s, 55.5 °C 40 s, 72 °C 25 s, 30个循环; 4 °C 10 min。16SrDNA的PCR产物由生工生物工程股份有限公司测序, 所得结果与GenBank数据库中的序列进行比对, 再用Mega 5.0软件构建系统发育树; 用2%

琼脂糖凝胶电泳检测巨大芽孢杆菌的PCR产物大小。

采用核糖体鉴定。从培养皿中挑取纯化的菌落, 加热灭活后, 进行RiboPrinter全自动微生物基因指纹鉴定。

2 结果

2.1 微生物计数检查

对4家企业产品分别进行计数方法适用性试验, 其中企业A和B需氧菌总数计数方法为平皿法(1:10供试液, 1 mL/皿), 企业C和D的需氧菌总数计数方法为平皿法(1:100供试液, 1 mL/皿); 4家企业霉菌和酵母菌总数计数方法均为平皿法(1:10供试液, 1 mL/皿)。详见表1(表中*表示所得数据为胰酪大豆胨琼脂培养基/沙氏葡萄糖琼脂培养基上的回收比值)。所有样品检查结果均符合规定。

表1 微生物计数方法适用性试验结果

Tab.1 Results of the applicability test of the microbial enumeration tests

企业	批号	稀释度	金黄色葡萄球菌	铜绿假单胞菌	枯草芽孢杆菌	白色念珠菌*	黑曲霉*
A	170602	1:10	0.63	0.76	0.90	0.80 / 0.85	0.87 / 0.80
B	20170601	1:10	0.74	1.03	0.76	0.93 / 0.99	0.89 / 0.87
C	20170501	1:10	0.49	0.84	0.68	0.93 / 0.84	0.98 / 0.87
		1:100	0.84	1.08	0.79	0.97 / 0.88	0.92 / 0.90
D	171102	1:10	0	0.40	0.87	0.91 / 0.95	0.92 / 0.87
		1:100	0.85	1.05	0.93	0.95 / 0.96	0.87 / 0.83

本次抽取的84件检品, 共涉及11批次, 抽样地区分布于26个省、自治区、直辖市, 每家企业抽取的检品次数、批号数和抽样地区数见表2。检出需氧菌集中于批号171102样品, 本次共抽取该批次15件, 其中7件检出需氧菌, 检出菌落数和抽样地区分布情况见表3, 其中“检出需氧菌菌落数”为用于需氧菌计数的2个平行平皿的菌落数之和; 因为企业D需氧菌计数是以1:100供试液采取平皿法进行试验, 报告需氧菌总数 = 检出需氧菌菌落数 / 2 × 100。

表2 4家企业抽样情况及地区数量

Tab.2 Sampling conditions of four manufacturers and number of sampling areas involved

企业	检品数(件)	批号数(批)	抽样地区(个)
A	45	4	21
B	6	2	5
C	10	3	7
D	23	2	12
合计	84	11	26

2.2 16SrDNA的系统发育分析及镜检结果

将11种污染菌的16SrDNA PCR扩增序列与GenBank数据库中的序列进行比对, 以同源性较高的已知序列作为参考, 构建系统发育树(见图1)。可见, 形态相似、

表3 企业D 7件检出污染菌样品的需氧菌菌落情况及抽样地区分布

Tab.3 The total number of aerobic bacteria of seven samples which detected contaminant bacteria in manufacturer D and distribution of their sampling areas

序号	检出数(cfu)	报告总数(cfu)	抽样地区
1	4	200	重庆
2	4	200	云南
3	6	300	广西
4	4	200	河南
5	2	100	湖北
6	2	100	湖南
7	6	300	广西

呈粗大杆状的YGFZ - 1 ~ 7为巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*); YGFZ - 9和YGFZ - 10为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*), YGFZ - 8和YGFZ - 11为短小芽孢杆菌(*Bacillus pumilus*)。16SrDNA的系统发育分析将这11种污染菌分为3类, 革兰染色后显微镜(见图2, 以3株菌为代表)下也观察到3种形态, 并且2种检验方式的结果相对应。

2.3 核糖体鉴定

11种污染菌基因指纹鉴定结果见表4。7株巨大芽孢杆菌选取其中的YGFZ - 3进行鉴定, 结果为巨

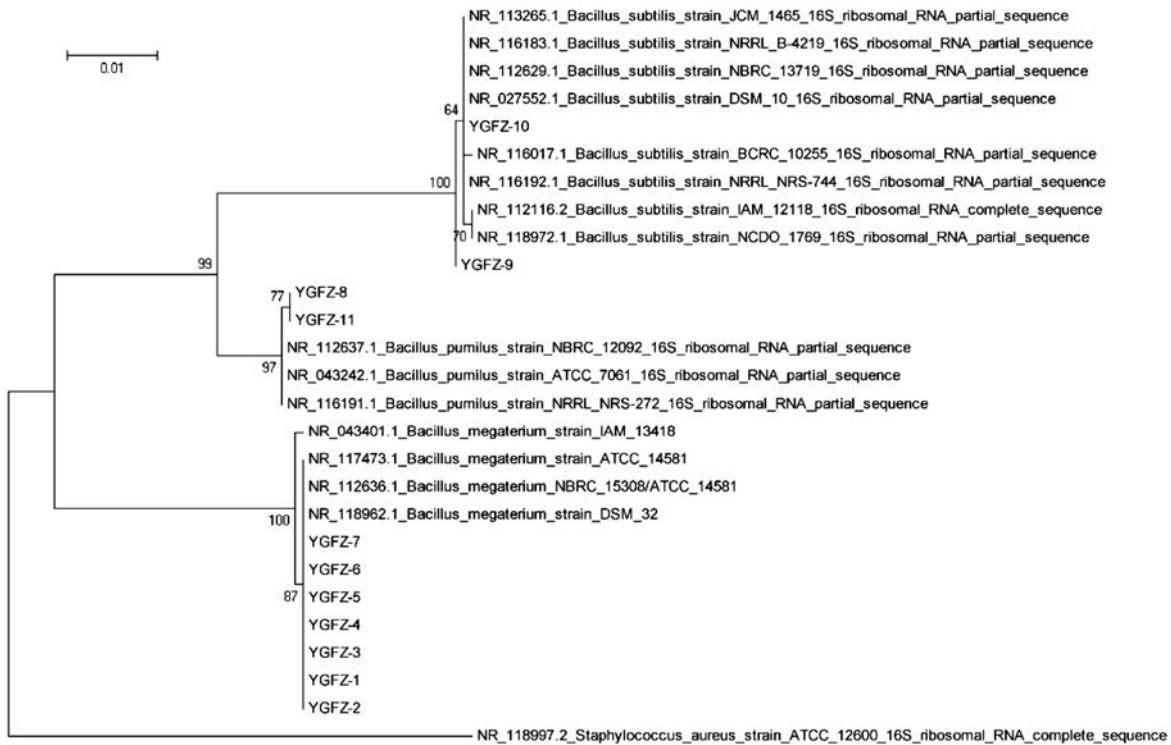
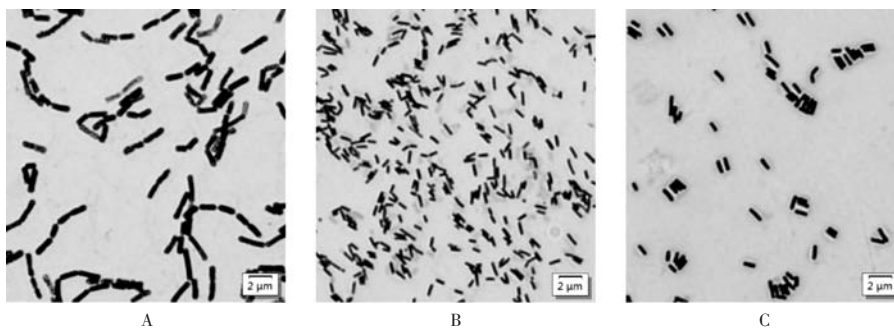


图1 污染菌16SrDNA基因序列的系统发育分析图

Fig.1 Phylogenetic analysis of 16SrDNA gene sequence of contaminant bacteria



A. YGFZ - 3 B. YGFZ - 8 C. YGFZ - 10

图2 YGFZ - 3, 8, 10菌株的革兰染色显微图

A. YGFZ - 3 B. YGFZ - 8 C. YGFZ - 10

Fig.2 Microscopic photograph of Gram - staining of YGFZ - 3, 8, 10

大芽孢杆菌,相似度为0.75。YGFZ - 9、YGFZ - 10为枯草芽孢杆菌,YGFZ - 8、YGFZ - 11为短小芽孢杆菌,相似度均大于0.85,与16SrDNA的系统发育分析一致。

表4 RiboPrinter鉴定结果

Tab.4 Results of the identification by RiboPrinter

编号	鉴定结果	相似度
YGFZ - 3	巨大芽孢杆菌	0.75
YGFZ - 8	短小芽孢杆菌	0.93
YGFZ - 9	枯草芽孢杆菌	0.87
YGFZ - 10	枯草芽孢杆菌	0.92
YGFZ - 11	短小芽孢杆菌	0.94

2.4 巨大芽孢杆菌特异性引物PCR结果

巨大芽孢杆菌的核糖体鉴定与系统数据库比较,相似度小于0.85,为进一步确认,用其特异性引物BML257 / BMR700进行PCR扩增。琼脂糖凝胶电泳图见图3,片段长度与目标片段长度(443 bp)相符。结合菌落形态、16SrDNA系统发育分析和核糖体鉴定的结果,确定污染菌YGFZ - 1 ~ 7为巨大芽孢杆菌。

3 讨论

药品抽验的目的是对上市后药品质量进行监测和综合评价,为药品监管工作提供技术支持。自2014年以来,国家药品评价抽验开设专项,对存在的风险和问题进行针对性和探索性研究,全面分析药品质量^[5]。近年来多家微生物检测实验室综合运用表型鉴定、基

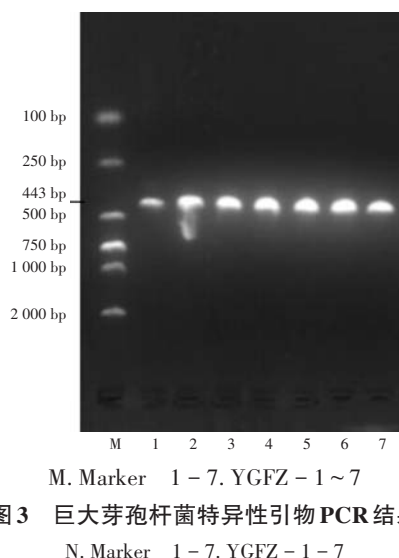


图3 巨大芽孢杆菌特异性引物PCR结果

Fig. 3 Results of PCR with specific primers of *Bacillus megaterium*

因型鉴定手段,包括 VITEK 2 COMPACT 全自动微生物生化鉴定系统、RiboPrinter®核糖体鉴定系统、MALDI-TOF-MS 技术和 16SrDNA 测序等,对国家药品评价样品检出的微生物进行鉴定、溯源,并发现有害或致病微生物^[6-7]。本次菌种鉴定根据实验室的条件和仪器,首先运用 16SrDNA 的基因测序和系统发育分析,初步确定污染菌种类,进一步采用核糖体鉴定,并用特异性引物 PCR 扩增的方法对核糖体鉴定相似度低的菌进行再确认。多种检测方式的综合运用,提高了鉴定结果的准确性和可信度,为菌种溯源提供有效参考,也为潜在危害性微生物的检测和鉴定提供了可行方案。

检出污染菌的 7 件样品均属同一企业同一批次,分别抽取于 6 个不同的省、自治区、直辖市,其中 1 个位于长江以北,2 个位于长江流域,3 个位于长江以南。本次分离的污染菌经鉴定均属芽孢杆菌属,并未呈现显著地域特性,且检验时包装完整、干净,因此分析污染菌的来源与流通环节的储存条件无关。本次抽取企业 D 的 2 批次样品,分别于 2 月和 11 月生产,其中 11 月的产品检出污染菌,因检验批次较少,无法分析出与生产季节的相关性。因此,分析污染菌可能主要源于以下生产环节:1)原材料,芽孢杆菌是土壤的优势种群之一,也是中药饮片耐热菌的主要来源^[8-9],乙肝扶正胶囊处方中多味药材是原粉直接入药,易引入芽孢杆菌;2)工作人员或生产环境中引入,因仅部分批次检出污染菌,而芽孢杆菌广泛存在于自然界中,如果消毒、灭菌不到位,也易引入污染。

药品生产中常用的灭菌法有辐照灭菌法、高压灭菌法等,其中辐照灭菌法是中药原粉制剂的主流灭菌手段^[5]。虽然辐照灭菌的效果较好,大部分微生物

经 ⁶⁰Co- γ 辐照后被杀灭,少部分微生物处于缺损状态,由于中药制剂含有适宜微生物生长的多种营养成分,一段时间后,部分微生物又能重新繁殖^[10]。若辐照剂量不合适,会改变中药材化学成分含量,降低药品的有效性^[11-13],并且辐照的残留对患者也造成安全隐患。因此,对药品尤其是含药材原粉中药制剂的微生物控制不能仅靠最终的辐照灭菌和限度检查,而应在整个生产过程中,严格按工艺流程要求和生产管理规范,对原料、环境、人员等各环节进行微生物检测监控,从而保证产品质量。

综上所述,4 家生产企业 84 件 11 批次的乙肝扶正胶囊微生物计数检查结果均符合规定,污染的微生物为芽孢杆菌,是原材料及生产环境中的常见菌,均为非致病菌。分析污染微生物的来源,可为该制剂或相关中成药的风险评估提供参考。

参考文献

- [1] 易伟,李思,吴晶晶,等.清肾丸的微生物限度检查及影响因素分析[J].中国医药导报,2020,17(30):138-141.
- [2] 张平,石春红,胡亚英,等.50种中药煎煮类饮片微生物检查方法研究及污染情况分析[J].中国药业,2021,30(3):40-44.
- [3] 姬俊,牛萌萌,刘彩娜,等.根痛平片微生物限度检查方法的研究[J].中国药业,2018,27(9):20-22.
- [4] 曹凤明.芽孢杆菌 PCR 鉴定方法的建立和应用[D].北京:中国农业科学院,2007.
- [5] 聂黎行,查祎凡,李静,等.基于 2018 年国家药品抽检探讨中药原粉制剂的质量现状[J].中国药学杂志,2019,54(19):1617-1621.
- [6] 甘永琦,农浚,朱荣,等.复方桔梗麻黄碱糖浆(II)的微生物污染状况分析及抑菌剂效力考察[J].中国药学杂志,2018,53(11):925-930.
- [7] 顾珉,沈海英,顾炳仁,等.药品抽检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.
- [8] 杨晓莉,李辉,绳金房,等.12种中药饮片耐热菌污染状况调查及风险评估[J].陕西中医,2016,37(6):740-743.
- [9] 甘永琦,农浚,樊兰艳,等.中药饮片耐热菌微生物类群的分析[J].中国中药杂志,2018,43(11):2274-2281.
- [10] 曹健,王芳,张卿,等.医院制剂的微生物稳定性及其影响因素初探[J].中国医院用药评价与分析,2011,11(2):159-161.
- [11] 马强,尹创.⁶⁰Co- γ 射线辐照对丹参中丹酚酸类成分的影响[J].中国药师,2018,21(8):1379-1382.
- [12] 孙建宇,陈红梅,李兆奎,等.⁶⁰Co- γ 射线辐照对赤芍和黄芩有效成分的影响[J].中国药师,2007,10(8):777-778.
- [13] 康江丽,吴变.⁶⁰Co- γ 辐照对丹香清脂颗粒中 5 种有效成分含量的影响[J].中国药业,2019,28(20):17-20.

(收稿日期:2021-10-11;修回日期:2021-12-16)