

析究州卷柏化学成分[J]. 中成药, 2018, 40(10): 2334-2337.

[11] 刘梦诗, 杨得坡, 杨婉玲, 等. 基于 UHPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS 技术分析四花青皮的成分[J]. 中国医院药学杂志, 2021, 41(23): 2395-2400; 2427.

[12] 吴建雄, 杨嵩虹, 郭怡敬, 等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS/MS 的陈皮醋制前后成分分析[J]. 中华中医药杂志, 2023, 38(9): 4321-4327.

[13] 陈嘉慧, 张雅心, 刘孟华, 等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS/MS 技术的丹参水提液全成分分析[J]. 广东药科大学学报, 2020, 36(1): 1-9.

[14] 武少茹, 冯伟红, 陈凯明, 等. UPLC-Q-TOF-MS/MS 结合 UPLC 表征夏枯草不同部位的化学组成及抗氧化活性研究[J]. 中国中药杂志, 2023, 48(17): 4569-4588.

[15] 张 驰, 张彩娟, 邱敏懿, 等. 丹参多化学成分的 UPLC-LTQ Orbitrap MS 快速表征解析[J]. 中医药学报, 2018, 46(3): 14-21.

[16] 蒋虎刚, 赵信科, 蔺文燕, 等. 基于 HPLC-Q-TOF-MS/MS 定性分析当归中多种香豆素类成分[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(13): 157-162.

[17] 张清清, 冯 媛, 李春花, 等. 基于 UPLC-Q-TOF/MS 技术快速鉴定当归中苯酞类和有机酸类成分[J]. 中国药房, 2022, 33(5): 579-585; 591.

[18] 张聪聪, 王长虹, 李兴佳, 等. 基于 UHPLC-Q-Orbitrap HRMS 分析桃仁化学成分及快速测定苦杏仁苷和野黑樱苷的含量[J]. 中国医院药学杂志, 2022, 42(4): 347-355.

[19] 刘 杰, 陈 琳, 范彩荣, 等. 基于 HPLC-DAD-Q-TOF-MS/MS 的白芍和赤芍主要成分定性定量研究[J]. 中国中药杂志, 2015, 40(9): 1762-1770.

[20] 刘 静, 霍志鹏, 田介峰, 等. 迷迭香酸及咖啡酸的 ESI 四级杆飞行时间高分辨质谱裂解规律研究[J]. 化工与医药工程, 2023, 44(3): 29-34.

[21] 张莹莹, 凌 霄, 李春晓, 等. 治疗甲状腺结节、乳腺增生、子宫肌瘤中药复方的用药共性规律[J]. 中成药, 2022, 44(1): 270-276.

[22] 龙苗苗, 程 贤, 赵振东, 等. 迷迭香酸药理作用及其递送系统的研究进展[J]. 中草药, 2023, 54(11): 3715-3724.

[23] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2020 年版一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 292-293.

基于 VITEK MS 及 VITEK2 Compact 的更年宁微生物污染调查

郭 琦
[河南省药品医疗器械检验院 (河南省疫苗批签中心), 河南 郑州 450018]

摘要: **目的** 研究更年宁微生物负载状况。**方法** 建立微生物限度检查方法并对全部样品进行微生物限度检查, 分离培养检查中出现的污染菌, 使用 VITEK MS 飞行时间质谱及 VITEK2 Compact 全自动微生物分析系统对分离菌株进行鉴定。**结果** 样品需氧菌总数存在不同程度的微生物污染问题, 霉菌、酵母菌总数及控制菌各项指标良好。需氧菌污染菌株以芽孢杆菌属为主, 其他种类需氧菌较少被检出, 2 种方法对菌种的鉴定结果存在差异。**结论** 更年宁需氧菌总数微生物污染问题不容忽视, 但未发现有严重致病性微生物。VITEK MS 及 VITEK2 Compact 联用时结果展现更丰富、直观、高效, 可为调查污染来源提供重要参考。

关键词: 更年宁; 微生物污染; VITEK MS; VITEK2 Compact; 菌种鉴定; 芽孢杆菌

中图分类号: R927.1 **文献标志码:** B **文章编号:** 1001-1528(2024)10-3523-06

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2024.10.057

更年宁是由柴胡、黄芩、白芍等 22 味中药组成的丸剂, 执行标准收载于《中华人民共和国卫生部药品标准(中药成方制剂第六册)》^[1], 制法提示该品种含药材原粉。前期中药材微生物污染研究表明, 经处理入药的药材尚含有一定量的致病菌和条件致病菌^[2], 由于微生物代谢活跃的特殊性, 其在中成药中可能产生未知化合物, 甚至分解有效成分, 导致药品本身质量及其安全性受到影响^[3-4]。微生物污染是国际上药品召回事件发生的重要原因

之一^[5], 也是目前制约我国中药制剂走向国际市场的重大因素^[6]。

药品微生物质量控制正向过程控制转变, 这种转变需要全面掌握药品生产过程原材料、环境、人员、设备、终产品等方面可能存在的微生物菌群, 在出现微生物异常事件时便于进行回顾性调查。本研究通过调查分析 2022 年国家药品监督抽检品种中成药制剂更年宁的微生物污染状况, 旨在全面了解目前市场流通的该制剂微生物负载状况, 以

期为调查污染源、控制药品质量提供参考。

到 66 批，均为水蜜丸，覆盖 22 个省、市及自治区，涉及 5 家生产企业（A~E），见表 1。

1 材料

1.1 样品 2022 年国家药品监督抽检品种更年宁共收集

表 1 更年宁信息

生产厂家	批次/批	来源
A	31	宁夏、福建、吉林、湖北、山东、重庆、陕西、青海、贵州、湖南、四川、河北、内蒙古、云南、西藏、海南
B	18	四川、吉林、重庆、新疆、湖北、江苏、山东、安徽、云南
C	6	福建、湖北、重庆、河南、内蒙古
D	9	山西、河南、云南、贵州、广东、辽宁、内蒙古
E	2	四川、内蒙古

1.2 培养基 胰酪大豆胨琼脂培养基（TSA，批号 0091450）、沙氏葡萄糖琼脂培养基（批号 0154856）、胰酪大豆胨液体培养基（TSB，批号 1026705、9231558）（美国 BD 公司）。

1.3 仪器 BD260 恒温培养箱（德国 Binder 公司）；AC2-4S1 生物安全柜（新加坡艺思高科技有限公司）；VITEK 微生物自动鉴定系统、MALDI-TOF MS 飞行时间质谱（法国梅里埃公司）。

2 方法

2.1 微生物限度检查

2.1.1 供试品溶液制备 取本品 10 g，加入胰酪大豆胨液体培养基至 100 mL，匀浆混匀，制成 1：10 供试品溶液，取 1 mL，加到 9 mL 胰酪大豆胨液体培养基中，制成 1：100 供试品溶液。

2.1.2 需氧菌总数、霉菌和酵母菌总数检查 采用平皿倾注法，取 1 mL 1：10 供试品溶液，注入直径 90 mm 的平皿中，平行制备 2 个；另取 1 mL 1：100 供试品溶液，注入直径 90 mm 的平皿中，平行制备 2 个。

2.1.3 控制菌检查 大肠埃希菌检查法：取 1：10 供试品溶液 10 mL，加到 100 mL 胰酪大豆胨液体培养基中，增菌培养。沙门菌检查法：取供试品 10 g，加到 200 mL 胰酪大豆胨液体培养基中，增菌培养。耐胆盐革兰阴性菌：取 1：10、1：100、1：1 000 供试品溶液各 1 mL，加到 10 mL 肠道菌增菌液体培养基中，增菌培养。后续步骤按 2020 年版《中国药典》四部通则 1106 项下方法进行。

2.1.4 方法适用性试验 每个厂家取 3 批样品，依据 2020 年版《中国药典》四部通则 1105、1106 项下方法进行微生物限度方法学适用性试验，抽检样品不足 3 批的，以其中一批重复 2 次。在需氧菌总数、霉菌和酵母菌总数计数方法适用性试验中，使用 1：10 供试品溶液平皿倾注法，发现各试验菌试验组菌落数减去供试品对照组菌落数的值与菌液对照组菌落数的比值均在 0.5~2 范围内，见表 2。在各控制菌检查方法适用性试验中，培养基中加入供试品溶液及相应试验菌菌悬液的样品作为试验组，仅加入供试品溶液的样品作为供试品组，仅加入稀释剂的样品作为阴性对照组，发现试验组均检出试验菌，见表 3。

表 2 平皿倾注法回收试验结果

批号(厂家)	需氧菌总数					霉菌和酵母菌总数	
	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	白色念珠菌	黑曲霉
210808(A)	0. 87	0. 97	1. 23	1. 07	1. 06	1. 01	0. 87
210805(A)	1. 10	1. 29	0. 92	1. 26	0. 94	1. 02	0. 95
201209(A)	1. 07	1. 09	1. 16	1. 10	1. 07	1. 03	0. 90
211201(B)	0. 97	1. 07	0. 82	1. 11	1. 02	1. 14	0. 76
210601(B)	1. 02	1. 30	0. 97	1. 07	1. 01	1. 13	1. 09
211001(B)	1. 15	0. 98	0. 75	1. 18	0. 91	1. 05	0. 93
200702(C)	1. 03	0. 99	1. 25	0. 92	0. 86	0. 85	0. 90
201201(C)	0. 86	1. 08	0. 93	0. 95	0. 81	1. 08	1. 03
201203(C)	0. 66	0. 89	0. 95	0. 73	0. 71	1. 01	0. 93
21033791(D)	0. 87	0. 93	0. 88	0. 81	0. 70	1. 15	1. 00
21030536(D)	0. 85	0. 86	0. 76	0. 85	0. 72	1. 09	0. 95
21030536(D)	0. 93	0. 91	0. 76	0. 75	0. 64	0. 94	1. 08
191001(E)	1. 16	0. 82	0. 66	1. 08	1. 07	0. 93	1. 02
191002(E)	1. 07	0. 83	1. 10	1. 28	1. 05	1. 09	0. 88
191002(E)	0. 94	1. 17	1. 07	0. 94	0. 92	1. 01	0. 93

2.2 菌种鉴定 取需氧菌总数检查培养平皿及控制菌选择性平板上生长的菌株，挑取单个菌落划线，进行分离纯化，按照不同仪器要求进行菌种鉴定。

2.2.1 VITEK2 Compact 法 取 32 ℃下培养 18~24 h 已分离纯化的菌株，依据革兰氏染色镜检结果选取相应鉴定卡，

3524

制备适宜浓度的菌悬液后进行鉴定。

2.2.2 VITEK MS 飞行时间质谱法 取培养 18~24 h 已分离纯化的菌株，挑取单菌落涂抹于靶点上，加入 1 μL CHCA 基质液，待干燥后放入 VITEK MS 仪器中，启动程序，将待测菌株、仪器数据库质谱图进行匹配。

表 3 控制菌检查方法适用性试验结果

批号(厂家)	大肠埃希菌			沙门菌			耐胆盐革兰阴性菌		
	试验组	供试品组	阴性对照组	试验组	供试品组	阴性对照组	试验组	供试品组	阴性对照组
210808(A)	+	-	-	+	-	-	+	-	-
210805(A)	+	-	-	+	-	-	+	-	-
201209(A)	+	-	-	+	-	-	+	-	-
211201(B)	+	-	-	+	-	-	+	-	-
210601(B)	+	-	-	+	-	-	+	-	-
211001(B)	+	-	-	+	-	-	+	-	-
200702(C)	+	-	-	+	-	-	+	-	-
201201(C)	+	-	-	+	-	-	+	-	-
201203(C)	+	-	-	+	-	-	+	-	-
21033791(D)	+	-	-	+	-	-	+	-	-
21030536(D)	+	-	-	+	-	-	+	-	-
21030536(D)	+	-	-	+	-	-	+	-	-
191001(E)	+	-	-	+	-	-	+	-	-
191002(E)	+	-	-	+	-	-	+	-	-
191002(E)	+	-	-	+	-	-	+	-	-

注：+表示平板上有典型阳性菌落生长，-表示平板上无菌落生长。

3 结果

3.1 需氧菌总数 5 个厂家中均有部分样品在规定标准范围内不同程度地检出需氧菌，根据数据分布特点分为 3 个范围，见图 1。由此可知，约 51.5% 的样品需氧菌总数小于 10 cfu/g，约 47.0% 的样品在 10~1 000 cfu/g 范围内，仅 1.5% 的样品大于 1 000 cfu/g，且实际检验结果为 2 000 cfu/g，仍远低于标准规定的 3×10⁴ cfu/g；厂家 A 抽样量较大，约占总体样品量的 47.0%，该厂家样品需氧菌总数计数结果在以上 3 个范围内的分别占比 58.1%、38.7%、3.2%，和总样品趋势基本一致；其余 4 个厂家由于抽样量小，且均未检出需氧菌总数大于 1 000 cfu/g 的样品，导致该比例存在较大差异。以计数结果<10 cfu/g、10~1 000 cfu/g 计，厂家 B 分别为 77.8%、22.2%；厂家 C 分别为 16.7%、83.3%；厂家 D 样品量虽有 9 批，但按不同生产批号计数的仅有 2 批，且均在 10~1 000 cfu/g 范围内；厂家 E 仅有 2 批样品，计数结果占比各 50%。

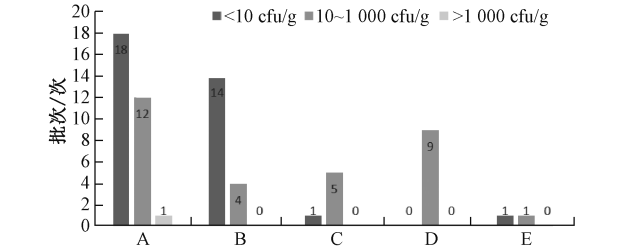


图 1 更年宁需氧菌总数样品量

3.2 霉菌、酵母菌总数 各批样品霉菌、酵母菌总数均在标准规定范围内，仅有 3 批大于 10 cfu/g，其余均<10 cfu/g。

3.3 控制菌检查 1 g 样品中均未检出大肠埃希菌，10 g 样品中均未检出沙门菌，1 g 样品中耐胆盐革兰氏阴性菌均小于 10 cfu。

3.4 鉴定结果 对分离纯化后的菌株分别采用“2.2.1”

“2.2.2”项下仪器进行鉴定，受菌株本身特性、培养时间、革兰氏染色结果、仪器参数及其他未知因素影响，2 台仪器鉴定结果存在部分误差，且部分菌株均不能得到有效鉴定结果。因此，本实验以 2 种仪器所鉴定的结果互为补充参考，见表 4~7。

3.5 负载微生物种类 在已有的对 2 种仪器比较研究中，VITEK MS 结果较为准确^[7]，且在临床微生物标本鉴定中具有较高的特异度和准确度^[8]；2 种仪器对临床常见病原菌鉴定一致性分析中，两者鉴定结果较为一致，但 VITEK MS 准确率更高^[9]。由表 4~7 可知，2 种仪器对同一菌株进行鉴定时部分结果存在差异，在使用 VITEK2 Compact 鉴定时，需要依赖待测菌株的革兰氏染色结果，而部分芽孢杆菌属、类芽孢杆菌属革兰氏染色结果受到培养时间长短的影响，且类芽孢杆菌属染色结果存在不稳定性^[10]，可能会影响鉴定。因此，如果存在 2 种仪器鉴定结果不同的情况，以 VITEK MS 鉴定结果为准。

66 批样品中共分离鉴定出 88 株菌株，包括芽孢杆菌属 *Bacillus* 78 株、类芽孢杆菌属 *Paenibacillus* 5 株、短小芽孢杆菌属 *Brevibacillus* 2 株及克洛诺菌属 *Cronobacter*、沙雷氏菌属 *Serratia*、棒状杆菌属 *Corynebacterium* 各 1 株，见表 8。

4 讨论

4.1 污染微生物类群分析 厂家 A~D 更年宁中芽孢杆菌属所占比例分别高达 93.9%、73.7%、90.0%、96.0%，说明芽孢杆菌属在该制剂中属于微生物污染的优势菌株。由于芽孢杆菌属及类芽孢杆菌属可溶解难溶性磷，促进植物吸收^[11]，巨大芽孢杆菌及枯草芽孢杆菌可产生生长素促进植物生长^[12-13]，因此其被作为益生菌被广泛应用于农业畜牧业领域的生物防治^[14-15]。我国是中药材种植大国，但多年连种及化肥不合理使用严重影响中药材的质量^[16]，近年来无公害种植的推广使得微生物肥料在中药材种植中的应用日渐广泛^[17]，因此原料药中极大可能会携带该类微生物。研究表明，中药材中沾染高丰度的细菌和真菌^[18]，制

表 4 厂家 A 分离菌株鉴定结果

编号	VITEK2 Compact	VITEK MS
A1	<i>Cronobacter dublinensis</i> ssp. <i>dublinensis</i>	—
A2	<i>Bacillus subtilis</i> / <i>amyloliquefaciens</i> / <i>atrophaeus</i>	<i>Bacillus subtilis</i> / <i>amyloliquefaciens</i> / <i>vallismortis</i>
A3	—	<i>Bacillus clausii</i>
A4	<i>Rhizobium radiobacter</i>	<i>Bacillus licheniformis</i>
A5	<i>Bacillus megaterium</i>	<i>Bacillus megaterium</i>
A6	<i>Brevibacillus choshinensis</i>	—
A7	<i>Bacillus subtilis</i> / <i>amyloliquefaciens</i> / <i>atrophaeus</i>	<i>Bacillus subtilis</i> / <i>amyloliquefaciens</i> / <i>vallismortis</i>
A8	<i>Bacillus megaterium</i>	<i>Bacillus megaterium</i>
A9	<i>Bacillus licheniformis</i>	<i>Bacillus licheniformis</i>
A10	<i>Bacillus megaterium</i>	<i>Bacillus megaterium</i>
A11	<i>Bacillus megaterium</i>	<i>Bacillus megaterium</i>
A12	<i>Bacillus subtilis</i> / <i>amyloliquefaciens</i> / <i>atrophaeus</i>	<i>Bacillus subtilis</i> / <i>amyloliquefaciens</i> / <i>vallismortis</i>
A13	<i>Rhizobium radiobacter</i>	<i>Bacillus subtilis</i> / <i>amyloliquefaciens</i> / <i>vallismortis</i>
A14	<i>Bacillus megaterium</i>	<i>Bacillus megaterium</i>
A15	<i>Bacillus pumilus</i>	<i>Bacillus altitudinis</i> / <i>pumilus</i>
A16	<i>Bacillus subtilis</i> / <i>amyloliquefaciens</i> / <i>atrophaeus</i>	<i>Bacillus subtilis</i> / <i>amyloliquefaciens</i> / <i>vallismortis</i>
A17	<i>Bacillus megaterium</i>	<i>Bacillus megaterium</i>
A18	<i>Bacillus subtilis</i> / <i>amyloliquefaciens</i> / <i>atrophaeus</i>	<i>Bacillus subtilis</i> / <i>amyloliquefaciens</i> / <i>vallismortis</i>
A19	—	<i>Bacillus megaterium</i>
A20	—	<i>Bacillus subtilis</i> / <i>amyloliquefaciens</i> / <i>vallismortis</i>
A21	<i>Bacillus pumilus</i>	<i>Bacillus altitudinis</i> / <i>pumilus</i>
A22	<i>Bacillus simplex</i>	<i>Bacillus simplex</i>
A23	<i>Bacillus subtilis</i> / <i>amyloliquefaciens</i> / <i>atrophaeus</i>	<i>Brevibacillus</i> spp.
A24	—	<i>Bacillus altitudinis</i> / <i>pumilus</i>
A25	—	<i>Bacillus altitudinis</i> / <i>pumilus</i>
A26	<i>Bacillus megaterium</i>	—
A27	<i>Bacillus pumilus</i>	—
A28	<i>Bacillus megaterium</i>	—
A29	<i>Bacillus megaterium</i>	—
A30	<i>Bacillus subtilis</i> / <i>amyloliquefaciens</i> / <i>atrophaeus</i>	<i>Bacillus subtilis</i> / <i>amyloliquefaciens</i> / <i>vallismortis</i>
A31	<i>Bacillus licheniformis</i>	—
A32	<i>Bacillus subtilis</i> / <i>amyloliquefaciens</i> / <i>atrophaeus</i>	—
A33	<i>Bacillus subtilis</i> / <i>amyloliquefaciens</i> / <i>atrophaeus</i>	—
A34	<i>Bacillus licheniformis</i>	<i>Bacillus licheniformis</i>

注：—表示未得到有效结果。

表 5 厂家 B 分离菌株鉴定结果

编号	VITEK2 Compact	VITEK MS
B1	<i>Serratia fonticola</i>	—
B2	<i>Eggerthia cateniformis</i>	<i>Bacillus simplex</i>
B3	<i>Cronobacter dublinensis</i> ssp. <i>dublinensis</i>	<i>Paenibacillus lautus</i>
B4	—	<i>Bacillus licheniformis</i>
B5	<i>Bacillus pumilus</i>	<i>Bacillus altitudinis</i> / <i>pumilus</i>
B6	—	<i>Bacillus subtilis</i> / <i>amyloliquefaciens</i> / <i>vallismortis</i>
B7	—	<i>Bacillus subtilis</i> / <i>amyloliquefaciens</i> / <i>vallismortis</i>
B8	<i>Corynebacterium jeikeium</i>	<i>Bacillus simplex</i>
B9	—	<i>Bacillus cereus</i> group
B10	<i>Bacillus pumilus</i>	<i>Bacillus altitudinis</i> / <i>pumilus</i>
B11	—	<i>Bacillus subtilis</i> / <i>amyloliquefaciens</i> / <i>vallismortis</i>
B12	<i>Bacillus subtilis</i> / <i>amyloliquefaciens</i> / <i>atrophaeus</i>	<i>Bacillus atrophaerus</i>
B13	<i>Bacillus subtilis</i> / <i>amyloliquefaciens</i> / <i>atrophaeus</i>	<i>Bacillus subtilis</i> / <i>amyloliquefaciens</i> / <i>vallismortis</i>
B14	<i>Paenibacillus polymyxa</i>	<i>Paenibacillus pabuli</i>
B15	—	<i>Bacillus subtilis</i> / <i>amyloliquefaciens</i> / <i>vallismortis</i>
B16	—	<i>Paenibacillus glucanolyticus</i>
B17	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	<i>Paenibacillus glucanolyticus</i>
B18	—	<i>Bacillus subtilis</i> / <i>amyloliquefaciens</i> / <i>vallismortis</i>
B19	—	<i>Bacillus megaterium</i>

注：—表示未得到有效结果。

表 6 厂家 C 分离菌株鉴定结果

编号	VITEK2 Compact	VITEK MS
C1	<i>Corynebacterium jeikeium</i>	—
C2	—	<i>Bacillus subtilis/amyloliquefaciens/vallismortis</i>
C3	<i>Bacillus subtilis/amyloliquefaciens/atrophaeus</i>	<i>Bacillus subtilis/amyloliquefaciens/vallismortis</i>
C4	—	<i>Bacillus subtilis/amyloliquefaciens/vallismortis</i>
C5	<i>Bacillus subtilis/amyloliquefaciens/atrophaeus</i>	<i>Bacillus subtilis/amyloliquefaciens/vallismortis</i>
C6	<i>Bacillus licheniformis</i>	<i>Bacillus licheniformis</i>
C7	<i>Bacillus subtilis/amyloliquefaciens/atrophaeus</i>	<i>Bacillus subtilis/amyloliquefaciens/vallismortis</i>
C8	—	<i>Bacillus subtilis/amyloliquefaciens/vallismortis</i>
C9	<i>Bacillus licheniformis</i>	—
C10	<i>Bacillus subtilis/amyloliquefaciens/atrophaeus</i>	—

注：—表示未得到有效结果。

表 7 厂家 D 分离菌株鉴定结果

编号	VITEK2 Compact	VITEK MS
D1	<i>Bacillus megaterium</i>	<i>Bacillus megaterium</i>
D2	<i>Bacillus pumilus</i>	<i>Bacillus altitudinis/pumilus</i>
D3	—	<i>Bacillus megaterium</i>
D4	<i>Bacillus pumilus</i>	<i>Bacillus altitudinis/pumilus</i>
D5	<i>Bacillus megaterium</i>	<i>Bacillus megaterium</i>
D6	<i>Bacillus subtilis/amyloliquefaciens/atrophaeus</i>	<i>Bacillus subtilis/amyloliquefaciens/vallismortis</i>
D7	—	<i>Bacillus altitudinis/pumilus</i>
D8	—	<i>Bacillus megaterium</i>
D9	<i>Bacillus megaterium</i>	<i>Bacillus megaterium</i>
D10	<i>Bacillus pumilus</i>	<i>Bacillus altitudinis/pumilus</i>
D11	—	<i>Bacillus megaterium</i>
D12	<i>Bacillus megaterium</i>	<i>Bacillus megaterium</i>
D13	—	<i>Bacillus megaterium</i>
D14	<i>Bacillus subtilis/amyloliquefaciens/atrophaeus</i>	<i>Bacillus subtilis/amyloliquefaciens/vallismortis</i>
D15	<i>Bacillus subtilis/amyloliquefaciens/atrophaeus</i>	<i>Bacillus subtilis/amyloliquefaciens/vallismortis</i>
D16	—	<i>Paenibacillus amylolyticus</i>
D17	<i>Bacillus megaterium</i>	<i>Bacillus megaterium</i>
D18	<i>Bacillus subtilis/amyloliquefaciens/atrophaeus</i>	<i>Bacillus subtilis/amyloliquefaciens/vallismortis</i>
D19	<i>Bacillus subtilis/amyloliquefaciens/atrophaeus</i>	<i>Bacillus subtilis/amyloliquefaciens/vallismortis</i>
D20	<i>Bacillus megaterium</i>	<i>Bacillus megaterium</i>
D21	<i>Bacillus megaterium</i>	<i>Bacillus megaterium</i>
D22	<i>Bacillus pumilus</i>	—
D23	<i>Bacillus subtilis/amyloliquefaciens/atrophaeus</i>	—
D24	<i>Bacillus megaterium</i>	<i>Bacillus megaterium</i>
D25	<i>Bacillus megaterium</i>	<i>Bacillus megaterium</i>

注：—表示未得到有效结果。

剂与原料药的微生物污染具有相关性^[19]，可能导致本实验中鉴定为芽孢杆菌属的占比较高。

使用 16S rRNA 手段时，能检测到更多批次中药饮片中共存的污染菌^[20]。芽孢杆菌属部分种类生长过程中会产生抗菌物质，对其他种类细菌或真菌生存有抑制作用^[21]，导致部分种类的污染菌株在初培养、分离纯化过程中不易被检出，说明传统的平板分离、表型鉴定方法对数量较少的污染菌可能存在漏检风险。因此，在日常药品生产、流通及监管过程中，有必要提高对该类中药制剂微生物污染控制的警惕性。

4.2 微生物鉴定与微生物限度检查 传统微生物限度检查方法的有效性已经过充分验证，但随着技术手段不断进步，其局限性日渐凸显，其中需氧菌总数和霉菌酵母菌总数只

能体现污染微生物数量水平。对从产品中分离出的污染微生物进行鉴定，能帮助调查人员更好地调查污染来源，并根据微生物种类对产品进行风险评估。VITEK2 Compact 和 VITEK MS 均为微生物表型鉴定手段，2020 年版《中国药典》四部通则 9204 项下微生物鉴定指导原则指出，许多初始培养物中分离出的受损微生物可能无法完全显示其表型属性，且这 2 种鉴定手段都依赖于自身数据库大小^[22]，故两者联用可最大程度地得到有效结果，并可互相佐证以确保其可信度。

2020 年版《中国药典》明确规定，当控制菌检查选择性平皿上出现疑似菌落时，需进行分离、纯化及适宜的鉴定试验。与传统生化鉴定比较，微生物鉴定仪自动化程度更高，人力消耗更低，覆盖面更广，结果更直观，但需要

表 8 污染微生物种类及其数量

厂家	菌株	数量/株
A	<i>Bacillus subtilis/amyloliquefaciens/vallismortis</i>	10
	<i>Bacillus megaterium</i>	10
	<i>Bacillus altitudinis/pumilus</i>	5
	<i>Bacillus licheniformis</i>	4
	<i>Brevibacillus choshinensis</i>	1
	<i>Bacillus clausii</i>	1
	<i>Bacillus simplex</i>	1
	<i>Brevibacillus</i> spp.	1
	<i>Cronobacter dublinensis</i> ssp <i>dublinensis</i>	1
B	<i>Bacillus subtilis/amyloliquefaciens/vallismortis</i>	6
	<i>Bacillus simplex</i>	2
	<i>Bacillus altitudinis/pumilus</i>	2
	<i>Paenibacillus glucanolyticus</i>	2
	<i>Bacillus licheniformis</i>	1
	<i>Bacillus cereus</i> group	1
	<i>Bacillus atrophaerus</i>	1
	<i>Paenibacillus lautus</i>	1
	<i>Paenibacillus pabuli</i>	1
	<i>Bacillus megaterium</i>	1
C	<i>Serratia fonticola</i>	1
D	<i>Bacillus subtilis/amyloliquefaciens/vallismortis</i>	7
	<i>Bacillus licheniformis</i>	2
	<i>Corynebacterium jeikeium</i>	1
	<i>Bacillus megaterium</i>	13
	<i>Bacillus subtilis/amyloliquefaciens/vallismortis</i>	6
	<i>Bacillus altitudinis/pumilus</i>	5
	<i>Paenibacillus amylolyticus</i>	1

配备仪器，培训检验人员，成本较高，普及度较低。在本实验对更年宁的调查中，控制菌选择性平皿上并未发现疑似菌落，但也只能代表某一种或几种特定的微生物在该次试验中未检出，结果具有一定随机性。因此，使用 VITEK2 Compact、VITEK MS 等微生物鉴定手段有助于更全面掌握该产品的微生物污染状况。

参考文献：

[1] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 中华人民共和国卫生部药品标准（中药成方制剂第六册）[S]. 1992：70.

[2] 严 丹，袁 星，解达帅，等. 中药饮片灭菌的研究现状与思考[J]. 中草药，2016，47(8)：1425-1429.

[3] 刘 鹏，杨美琴，戴 羣，等. 固体药用硬片的微生物污染状况分析[J]. 药物分析杂志，2018，38(9)：1573-1578.

[4] 李国红，张克勤，沈月毛，等. 枯草芽孢杆菌对 50 种中药的发酵及抗菌活性检测 [J]. 中药材，2006，29（2）：154-157.

[5] 武雅文，王 莹，车 阳，等. 国际微生物污染相关药品召回回顾分析（2013—2019）[J]. 中国现代应用药学，2021，38(15)：1870-1877.

[6] 霍晓菲，刘卫德，刘绪平，等. 中药材及中药饮片微生物污染研究[J]. 药品评价，2021，18(23)：1469-1472.

[7] 贾琴妹，杨传莲，黄艳梅. VITEK-2 Compact 全自动微生物鉴定仪与 VITEK MS 质谱仪在摩根摩根菌鉴定中的应用及评价[J]. 疾病监测，2020，35(11)：1025-1030.

[8] 杨川艺. VITEK MS 质谱仪对尿路感染的鉴定价值[J]. 黑龙江中医药，2021，50(6)：216-217.

[9] 周淑燕，柳丽娟，卓传尚，等. 梅里埃 MALDI-TOF-MS 系统与 VITEK 2 Compact 全自动微生物鉴定仪对临床常见病原菌鉴定的一致性分析[J]. 现代检验医学杂志，2020，35(2)：92-96.

[10] 刘忠霞，陈文峰. 微生物学实验教学用鞭毛染色的良好菌种——灿烂类芽孢杆菌的鉴定[J]. 生物学通报，2007，42(6)：48-50；63.

[11] 欧善生，张慎举. 生物农药与肥料[M]. 北京：化学工业出版社，2011：111-112.

[12] 库永丽. 生防细菌 C3 防治猕猴桃根腐病的效果及机制研究[D]. 杨凌：西北农林科技大学，2018.

[13] 李 娜. 巨大芽孢杆菌 TA-4 的分离鉴定及其生物有机肥对番茄生长和土壤微生物群落的影响[D]. 泰安：山东农业大学，2020.

[14] 刘国红，林乃铨，林营志，等. 芽孢杆菌分类与应用研究进展[J]. 福建农业学报，2018，23(1)：92-99.

[15] 周智博，王卿惠，郭欣欣，等. 解淀粉芽孢杆菌抑菌蛋白研究进展[J]. 高师理科学刊，2022，42(4)：64-69.

[16] 张亚琴，邓秋林，文秋姝，等. 浅谈科学施肥在中药材生态种植中的作用与措施[J]. 中国中药杂志，2020，45(20)：4846-4852.

[17] 黄 钦，尉广飞，常瑞雪，等. 微生物肥料发展现状及其在中药材种植中的应用[J]. 中国现代中药，2022，24(1)：153-159.

[18] 段金连，李 月，张路梅，等. 中药注射剂中药材的微生物污染[J]. 云南中医学院学报，2019，42(4)：1-8.

[19] 刘 鹏，战宏利，严倩倩，等. 中成药口服给药制剂及其原料药微生物污染相关性分析[J]. 药物分析杂志，2014，34(6)：1068-1072.

[20] 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.

[21] 曹树威，余昌花，罗鲜青，等. 芽孢杆菌特性及其在畜牧生态养殖中应用研究进展[J]. 中国兽药杂志，2021，55(11)：77-85.

[22] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典：2020 年版四部[S]. 北京：中国医药科技出版社，2020：503-506.