

枳壳水活度迁移规律与载荷微生物生长变化考察

易 巧, 章 红, 龚 玮*

(江西省药品检验检测研究院, 国家药品监督管理局中成药质量评价重点实验室, 江西省药品与医疗器械质量工程技术研究中心, 江西 南昌 330029)

摘要: **目的** 考察枳壳水活度迁移规律与载荷微生物生长变化, 为其质量安全提供理论基础。**方法** 优化枯草芽孢杆菌、大肠埃希菌从沙子转移到药材的操作步骤, 分别将干法、湿法接种枯草芽孢杆菌的药材置于不同水活度 (a_w) 环境下, 分析水分迁移规律和枯草芽孢杆菌浓度变化规律; 将接种大肠埃希菌的药材分别置于 4、23、35 °C 及不同 a_w 环境下, 分析大肠埃希菌浓度变化规律。考察储存温度、 a_w 对枳壳中的大肠埃希菌的影响。**结果** 药材 a_w 在 1 周后有明显变化, 并逐渐与环境 a_w 趋于一致。干法、湿法接种枯草芽孢杆菌的浓度分别约为 5、8 logCFU/g, 接种大肠埃希菌的浓度分别约为 4、3 logCFU/g。湿法接种使药材更易霉变。接种后, 枯草芽孢杆菌不受接种方法、环境 a_w 的影响, 放置 12 周其浓度无明显变化; 大肠埃希菌浓度随时间延长不断降低, 而且受环境 a_w 、温度的影响。**结论** 干法或湿法接种的枯草芽孢杆菌在枳壳上都有长期生存能力, 而且其浓度不受环境变化影响, 而大肠埃希菌无长期生存能力。

关键词: 枳壳; 水活度; 迁移规律; 枯草芽孢杆菌; 大肠埃希菌; 生长

中图分类号: R282

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2024)10-3515-04

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2024.10.055

中药饮片质量一直是大家关注的热点, 其微生物污染状况严重^[1-2], 检出率较高的有耐热菌、大肠埃希菌等^[3-6]。枳壳来源于芸香科植物酸橙 *Citrus aurantium* L. 及其栽培变种的干燥未成熟果实, 主要分布于我国江西、浙江等地^[7], 通过干燥、炮制等生产加工过程可降低携带的杂菌, 但从生产加工到储藏运输过程中产生的灰尘有可能会污染^[8], 对该药材进行微生物限度检查后发现存在微生物污染, 经分离鉴定为枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*), 它是耐热菌和条件致病菌^[9], 服用后会有健康隐患^[10]。目前, 相关文献大多是对中药饮片微生物污染的考察, 而对食源性病原体在中药材上的存活状态尚无报道, 李辉等^[11]研究了水活度对中药胶囊剂、丸剂中微生物的影响, 发现不同微生物受环境水活度的影响有所差异。

本实验模拟枳壳受污染过程, 采用干法、湿法接种法^[12]分别将枯草芽孢杆菌、大肠埃希菌接种至该药材中, 得到一个菌浓度稳定的样本载体, 再将其置于不同水活度或温度的密闭环境中, 对其水活度 (a_w) 变化规律和枯草芽孢杆菌、大肠埃希菌生长规律进行研究。

1 材料

1.1 仪器 Aqualab 4T 水活度仪 (美国 Decagon 公司); T601-L 电子天平 (北京赛多利斯仪器系统有限公司); Heal Force-900C 生物安全柜 (上海力申科学仪器有限公

司); PYX-DHS 细菌培养箱 (上海跃进医疗器械厂); YXQ-LS-50S II 高压蒸汽灭菌器 (上海博讯实业医疗器械有限公司)。

1.2 试剂与药物 胰酪大豆胨液体培养基 (批号 20221024, 北京三药科技有限公司); 胰酪大豆胨琼脂培养基 (批号 220426, 北京陆桥技术有限责任公司); 大肠埃希菌显色培养基 (批号 P002026, 法国 CHROMagar 公司)。枳壳购于淘宝购物平台, 经江西省药品检验检测研究院主任中药师万林春鉴定为芸香科植物酸橙 *Citrus aurantium* L. 的干燥未成熟果实壳, 使用前在常温下储存小于 6 个月。

1.3 菌种 大肠埃希菌 [*Escherichia coli*, 编号 CMCC (B) 44102] 由中国食品药品检定研究院医学菌种保藏中心提供, 工作使用第 3 代传代菌种; 枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 从枳壳中分离纯化, 经鉴定后于 -80 °C 保存。

2 方法及结果

2.1 菌液制备 分别将枯草芽孢杆菌、大肠埃希菌接种到胰酪大豆胨液体培养基 TSB 中, 在 (37±2) °C 下孵育 24 h。将培养物 (1 mL) 铺在 TSA 斜面平板上, 并在 (37±2) °C 下培养 24 h, 向每个平板中加入 5 mL 0.1% 蛋白胨, 冲洗斜面上菌苔, 并将菌悬液转移到无菌试管中, 0.1% 蛋白胨稀释, 涡旋混合 30 s, 菌悬液连续稀释, 并取 1 mL 至无菌

收稿日期: 2023-10-27

基金项目: 江西省药品监督管理局科研项目 (2019JS31, 2021KY44)

作者简介: 易 巧 (1984—), 女, 副主任药师, 研究方向为药品质量分析。Tel: (0791) 88158796, E-mail: 110835631@qq.com

* 通信作者: 龚 玮 (1979—), 女, 主管药师, 研究方向为药物分析及药品、化妆品毒理学。Tel: 13870668865, E-mail: 16094870@qq.com

平皿中，倾倒入 45℃胰酪大豆胨琼脂培养基，培养 24 h，大肠埃希菌、枯草芽孢杆菌计数均为 9~10 logCFU/mL。

2.2 枳壳湿法接种 称取枳壳 2 份，每份 100 g，装入无菌袋中，分别加入 6 mL 枯草芽孢杆菌菌液、10 mL 大肠埃希菌菌液，上下左右摇动无菌袋，并用手揉搓约 5 min，在 23℃下干燥，直至 a_w 与未接种样品的相当（接种后 7 d），干燥后将枳壳转移到无菌呼吸袋中，进行细菌计数（之前微生物检验中按照 2020 年版《中国药典》四部^[13]进行方法学考察，发现枳壳对药典中规定的 5 株菌均无抑制作用，故可采用常规法进行检测）。称取枳壳 10 g，置于无菌锥形瓶中，加入 100 mL 0.1% 蛋白胨进行连续稀释，取适当浓度的稀释液 1 mL，置于无菌平皿中，倾倒入 45℃ TSA 培养基检测枯草芽孢杆菌，大肠埃希菌显色培养基检测大肠埃希菌，培养 24 h 后计数，结果见表 1。

表 1 枳壳水活度、细菌计数测定结果（湿法接种）

接种菌	枯草芽孢杆菌		大肠埃希菌	
	接种后	干燥后	接种后	干燥后
计数/(CFU·g ⁻¹)	8.4	8.0	7.2	3.3
a_w	0.733	0.572	0.855	0.591

2.3 干法接种物制备 石英砂在 140℃下干热灭菌 2 h，菌液制备同“2.1”项，为了抵消加热干燥导致的菌浓度降低，延长大肠埃希菌在 TSA 斜面的培养时间至 48 h。将 2 种菌溶液与灭菌后的石英砂分别以 15 mL/100 g 比例混合在无菌袋中，用手轻揉搓接种沙子约 5 min，尽量混匀，将接种的混合物装到麦迪康无菌自封袋中，按“2.2”项下方法计数，大肠埃希菌、枯草芽孢杆菌浓度分别为 9.5、8.5 logCFU/g。同时，将接种混合物置于 42℃培养箱中干燥 48 h 后转移到无菌袋中，用手混合揉搓以粉碎团块。接种前，将干燥的接种混合物进行细菌计数、 a_w 测定，结果前者大肠埃希菌、枯草芽孢杆菌的计数结果分别为约为 6.7、7.8 logCFU/g，后者小于枳壳（<0.45）。

2.4 枳壳干法接种 称取枳壳 10 g，置于无菌锥形瓶中，0.1% 蛋白胨稀释至 100 mL，作为 1:10 供试液，取 1 mL 至无菌平皿中，分别倾倒入 45℃大肠埃希菌显色培养基、胰酪大豆胨固体培养基 TSA，培养 24 h，测得平板中无大肠埃希菌、枯草芽孢杆菌的典型菌落，而枳壳中大肠埃希菌、枯草芽孢杆菌均小于 10 cfu/mL。

2.4.1 大肠埃希菌干法接种 取大肠埃希菌载体石英砂 50 g、枳壳 100 g，一同置于无菌袋中，通过摩擦、摇动、滚动等方式手动混合约 10 min，置于 2020 年版《中国药典》四部 0982 粒度和粒度分布测定法中的 1 目无菌筛中摇动约 1 min 后将两者分离，采用大肠埃希菌显色培养基对接种后的枳壳进行计数，结果约为 4 logCFU/g。

2.4.2 枯草芽孢杆菌干法接种 将 10 g 接种载体石英砂与 100 g 枳壳混合，摇晃、揉搓约 5 min，经无菌筛去除石英砂，接种后进行细菌计数，结果约为 5 logCFU/g。

2.5 a_w 对枯草芽孢杆菌生长的影响 制备 MgCl₂、Mg(NO₃)₂、NaCl、K₂SO₄ 饱和溶液各 500 mL，置于密闭干燥

器中， a_w 分别为 0.328、0.529、0.753、0.973。将干法、湿法接种的枳壳置于密闭饱和溶液中，于 1、2、3、4、6、8、10、12 周测定 a_w ，并对枯草芽孢杆菌进行计数。

2.5.1 a_w 迁移规律 实验前，干法、湿法接种枯草芽孢杆菌后 a_w 分别为 0.558、0.572，其随时间变化的曲线见图 1。由此可知，储存于 4 种 a_w （0.328、0.529、0.753、0.973）环境中时，枳壳 a_w 在 1 周后有明显变化，并逐渐与环境 a_w 趋于一致；环境 a_w 为 0.328 时，储存 1 周后干法、湿法接种枳壳 a_w 分别为 0.372、0.412，第 5 周时两者 a_w 几乎一致，并且随着放置时间延长无明显变化，12 周时分别为 0.334、0.341；环境 a_w 为 0.529 时，1 周后干法、湿法接种枳壳 a_w 分别为 0.513、0.503，随着储存时间延长无明显变化；环境 a_w 为 0.973 时，1 周后干法、湿法接种枳壳 a_w 分别为 0.798、0.752，第 6 周时两者几乎一致，随着放置时间延长逐渐向环境 a_w 靠拢，并且分别在储存 10、8 周时有明显霉变。综上所述，接种方法会对枳壳适应环境 a_w 产生一些影响，干法接种更易适应，随着时间延长两者都趋于一致，并且环境 a_w 越大，达到环境所需时间越长。

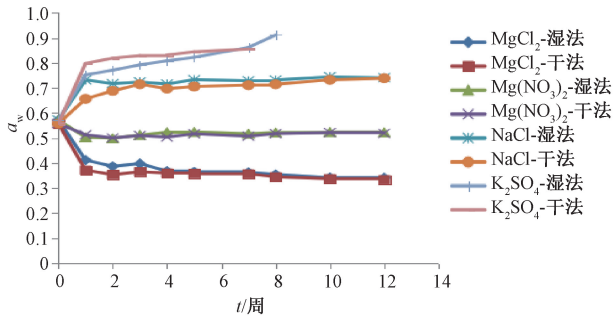


图 1 枳壳 a_w -时间曲线

2.5.2 枯草芽孢杆菌生长规律 图 2 显示，在不同 a_w 环境下储存时，干法、湿法接种枳壳中枯草芽孢杆菌生长曲线呈平稳趋势，其中湿法接种枳壳在 K₂SO₄ 饱和溶液中储存 8 周时有明显霉变，而干法接种则在 10 周时出现；储存 12 周后，载荷枯草芽孢杆菌量与初始量相当。综上所述，接种方法、低环境湿度对枯草芽孢菌生长无明显影响，但湿度太大会导致枳壳霉变，而且湿法接种由于改变了药材特质，导致霉变更易发生。

2.5.3 温度 在 5、45℃下枳壳 a_w 随时间变化的曲线见图 3。由此可知， a_w 在第 1 周变化明显，并逐渐与环境 a_w 保持一致；饱和盐溶液在不同温度中的 a_w 有差异，温度越高，其解离出来的离子数量越多，水合能力越显著，并且 a_w 随着温度升高而降低^[14]，故在 5℃下保存 12 d 后 a_w 较 45℃下更高；5、45℃下在饱和氯化钠溶液中的 a_w 最接近，而在饱和氯化镁溶液中差异最大；45℃下在饱和硫酸镁溶液中 2 d 内 a_w 即达 0.932，而 5℃下在饱和硫酸镁溶液中 2 周内 a_w 尚未达到平衡。综上所述，温度越高，达到 a_w 平衡的时间越短，在 5、45℃下 4 种 a_w 中枯草芽孢杆菌浓度无明显变化，即温度对其生长影响不大。

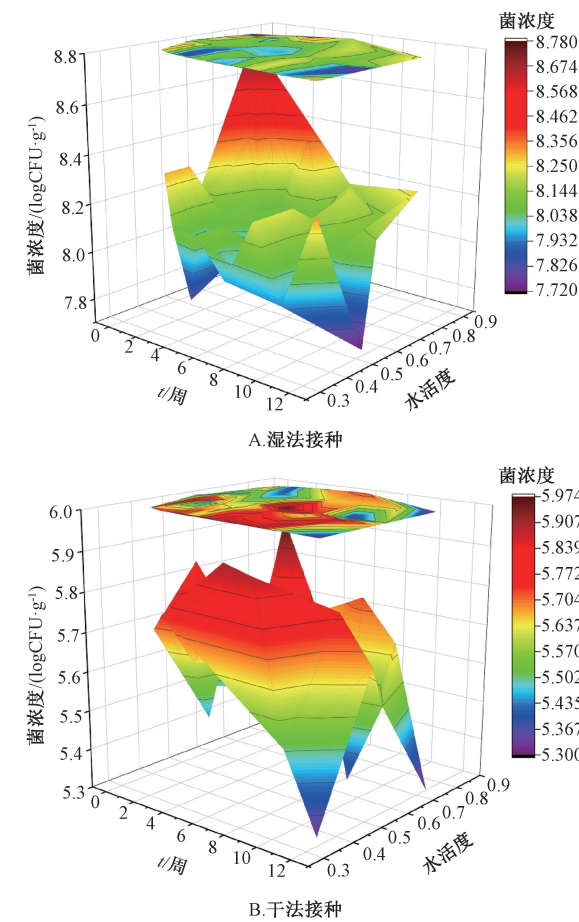


图2 接种枳壳的枯草芽孢杆菌生长情况

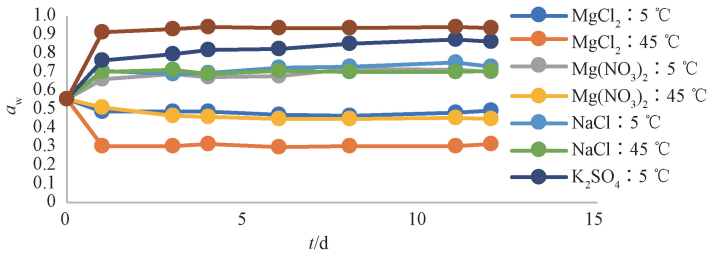


图3 不同温度下aw迁移规律

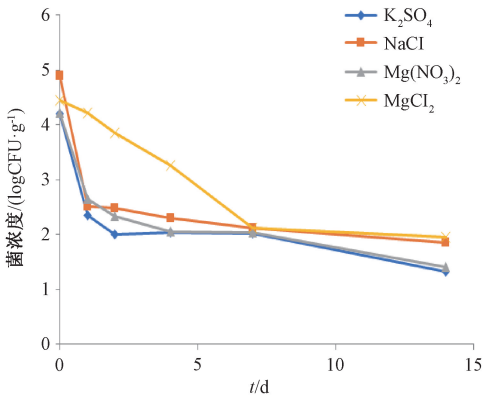


图4 大肠埃希菌在不同aw下生长情况

2.6 大肠埃希菌生长规律 将接种大肠埃希菌的枳壳置于“2.5”项下密闭饱和容器中，于0、1、2、4、7、14 d按“2.4.1”项下方法进行计数，结果见图4。再将其分别置于4、23、33 ℃环境下进行计数，结果见图5。

由图4可知，在 a_w 0.529、0.753、0.973环境下放置1 d后，菌浓度分别下降1.6、2.4、1.8 logCFU/g，而14 d后分别下降2.8、3.1、2.8 logCFU/g；在 a_w 0.328环境下放置1、2、4、7 d后，菌浓度分别下降0.2、0.6、1.2、2.3 logCFU/g，而14 d后下降了2.5 logCFU/g。由图5可知，在33 ℃下7 d后未检出大肠埃希菌（取1：10样品10 mL，加入双倍乳糖胆盐发酵管中，在35 ℃下放置24 h时，发酵管未产气，结果为阴性，故大肠埃希菌浓度小于1 CFU/g）；在4、23 ℃下14 d后菌浓度分别下降1.1、2.7 logCFU/g。综上所述，枳壳中大肠埃希菌在4 ℃下存活率最高，33 ℃下最低。

3 讨论与结论

本研究选择石英砂作为干法接种载体，分别采用湿法和干法进行接种，发现湿法接种枯草芽孢杆菌的浓度（8 logCFU/g）大于干法接种（5 logCFU/g），但在高 a_w 环境中储存时前者较后者更易发生霉变。在干湿法接种过程中，大肠埃希菌浓度在干燥前后分别下降2.8、3.9 logCFU/g，而枯草芽孢杆菌分别仅降低了0.7、0.4 logCFU/g，推测可能由于大肠埃希菌没有芽孢，受温度影响较大。

枯草芽孢杆菌生长所需最低水活度为0.90^[15]，但将干湿法接种枯草芽孢杆菌的枳壳分别置于不同水活度（0.328、0.529、0.753、0.973）、温度（5、45 ℃）下放

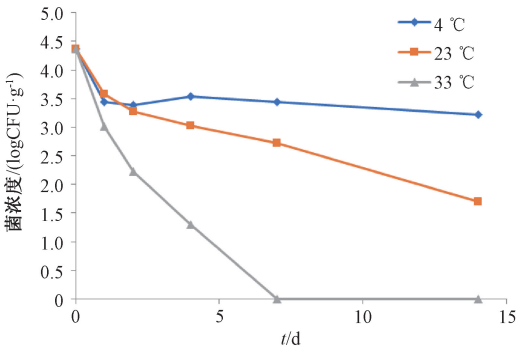


图5 大肠埃希菌在不同温度下生长情况

无明确相关性，而与初始载荷有关。因此，要有效防止生产、加工、运输过程中的污染。

置12周时，菌种没有明显增殖或死亡，表明它与储存环境

温度会影响大肠埃希菌的下降速度，温度越高，后者下降越快，枳壳置于 33 ℃ 下 2 周后其载荷大肠埃希菌已小于 1 CFU/g。前期采用相同的接种方法将大肠埃希菌接种到穿心莲中，发现该菌种也存在浓度不断降低的趋势，下降速度依次为 33 ℃ > 23 ℃ > 4 ℃。因此，常温下大肠埃希菌在中药饮片中没有长期生存能力，规范中药饮片生产、流通等环节可有效减少其在中药饮片中的载荷。

USP 1112 基于水活度推荐微生物限度检查策略，减少了一些药物的日常微生物检查^[16-17]，这是基于药物有严格的 GMP 生产要求，保证药物有固定的原辅料，厂房能合理布局，按功能和防污染的原则进行规划。我国中药饮片来源复杂，且从生产加工到运输储存都缺乏有力的管理规范^[18-19]，很难保证产品质量的稳定性，单纯依靠控制水活度来减少微生物限度检查不能有效保证中药饮片质量。因此，只有强化过程控制，使中药饮片各环节中的微生物污染处于可控状态，才能降低其风险^[20]。

参考文献：

[1] 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): 922-927.

[2] 龙江玲, 黄莹莹, 杨 婷, 等. 岭南饮片制枳壳不同化学部位对功能性消化不良大鼠的影响 [J]. 今日药学, 2021, 31(11): 839-843.

[3] Chitrakar B, Zhang M, Adhikari B. Dehydrated foods; are they microbiologically safe? [J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2019, 59(17): 2734-2745.

[4] 邓海英, 龚勇祥, 李连凤, 等. 中药饮片微生物污染现状及典型菌鉴定研究进展 [J]. 中草药, 2019, 50(9): 2242-2250; 2256.

[5] 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): 1671-1676.

[6] 张光华, 王似锦, 江志杰, 等. 北京地区销售的 10 种中药饮片微生物污染程度考察 [J]. 中国药房, 2018, 29(14): 1940-1944.

[7] 范一灵, 李琼琼, 房 蕊, 等. 上海地区 10 种中药饮片微

生物污染情况研究 [J]. 中草药, 2015, 46 (13): 1908-1913.

[8] 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.

[9] 孙 莺, 王玉梅, 何晓英, 等. 甘肃省道地药材黄芪、甘草、板蓝根中药饮片的微生物污染状况研究 [J]. 卫生职业教育, 2020, 38(22): 119-122.

[10] 刘 鹏, 战宏利, 杨美琴, 等. 红花的微生物污染状况分析 [J]. 药物分析杂志, 2015, 35(7): 1257-1262.

[11] 李 辉, 马仕洪, 王似锦, 等. 基于水分活度的非无菌中药制剂微生物控制策略的研究 [J]. 中国现代应用药学, 2022, 39(1): 55-60.

[12] Xu S W, Chen H Q. The influence of almond's water activity and storage temperature on salmonella survival and thermal resistance [J]. *Food Microbiol*, 2023, 113: 104269.

[13] 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: 149-151.

[14] Jimenez Y P, Coronas A, Hernandez-Luis F. Water activities of sodium molybdate solutions at different temperatures [J]. *Fluid Phase Equilibria*, 2018, 476: 131-138.

[15] 易 巧, 熊 骏, 刘绪平. 枯草芽孢杆菌生长所需最低水分活度的考察与验证 [J]. 中国药学杂志, 2021, 56(6): 497-501.

[16] The United States Pharmacopieial Convention. United States Pharmacopeia [M]. 41th Ed. Baltimore: United Book Press, 2018: 1178-1180.

[17] Syamaladevi R M, Tang J M, Villa-Rojas R, *et al.* Influence of water activity on thermal resistance of microorganisms in low-moisture foods: a review [J]. *Compr Rev Food Sci Food Saf*, 2016, 15(2): 353-370.

[18] 颜雨雯. 影响中药饮片质量的因素分析与针对性质量控制对策 [J]. 中医药管理杂志, 2023, 31(14): 141-143.

[19] 张 军, 石典花, 戴衍朋, 等. 58 家医疗机构中药饮片调研及质量提升相关建议 [J]. 中国医院, 2022, 26(2): 36-38.

[20] Beuchat L R, Komitopoulou E, Beckers H, *et al.* Low-water activity foods: increased concern as vehicles of foodborne pathogens [J]. *J Food Prot*, 2013, 76(1): 150-172.