

# 不同剂型维C银翘制剂微生物检验方法适用性研究及污染分析



滕 钰, 薛 雪, 杨 爽, 薛咏兰

贵州省食品药品检验所 (贵阳 550081)

**【摘要】目的** 建立国家药品抽检品种维 C 银翘系列制剂的微生物限度检查方法, 并对其微生物污染情况开展分析, 为其监管提供参考。**方法** 按《中国药典 (2020 年版)》要求, 开展微生物限度检查方法适用性研究, 并对计数结果、检出菌开展分析。**结果** 可用 1 : 50、1 : 10 供试液开展维 C 银翘片与维 C 银翘胶囊 (硬胶囊) 需氧菌总数、霉菌和酵母菌总数检验; 用 1 : 10 供试液开展软胶囊计数检验; 用 1 : 20、1 : 10 供试液分别开展颗粒剂需氧菌总数、霉菌和酵母菌总数检验; 大肠埃希菌可用常规法开展检验; 212 批样品均符合规定; 污染菌以芽孢杆菌属为主; 某企业检出的 3 株蜡样芽孢杆菌菌株的同源性较高; 从另 1 企业产品检出 1 株布鲁氏菌属菌株。**结论** 所建立的微生物限度检查方法准确度高, 可用于该系列产品的质量控制在; 该系列产品微生物检查结果总体良好, 但仍需企业及时发掘并研判生产过程的质量风险, 以充分保障药品安全。

**【关键词】** 维 C 银翘系列制剂; 微生物限度检查; 方法适用性; 污染状况分析

**【中图分类号】** R927.1 **【文献标识码】** A

## Study on the applicability of microbial testing methods and contamination of different dosage forms of vitamin C Yinqiao preparations

TENG Yu, XUE Xue, YANG Shuang, XUE Yonglan

Guizhou Institute for Food and Drug Control, Guiyang 550081, China

Corresponding author: XUE Yonglan, Email: anshuexueyonglan@163.com

**【Abstract】Objective** To establish the microbial limit test method and analyze the microbial pollution for vitamin C Yinqiao series preparations in the national drug sampling and inspection, and provide reference for regulation. **Methods** According to the requirements of *Chinese Pharmacopoeia* (2020 edition), the examination methods about microbial limit were studied, and the counting results and detected bacteria were analyzed. **Results** Test solutions of 1 : 50 and 1 : 10 were used in the microbial tests on the total number of aerobic bacteria, mold and yeast in vitamin C Yinqiao tablets and vitamin C Yinqiao capsules (hard capsules). Test solution of 1 : 10 was used in the counting test in soft capsules, while the microbial tests on the total number of aerobic bacteria, mold and yeast were conducted in granules using 1 : 20 and 1 : 10 test solutions, respectively. *Escherichia coli* could be tested by conventional methods. All 212 batches of samples fitted to the quality requirements. Most of the contaminative microorganisms tested

DOI: 10.12173/j.issn.2097-4922.202406048

基金项目: 贵州省中医药管理局中医药、民族医药科学技术研究课题 (QZY-2024-195)

通信作者: 薛咏兰, 主管药师, Email: anshuexueyonglan@163.com

<https://yxqy.whuzhmedj.com>

from the samples were genus *Bacillus*, while 3 strains of bacteria of *Bacillus cereus* group detected from a certain enterprise had high homology, and 1 strain of genus *Brucella* was detected from another enterprise. **Conclusion** The established microbial limit test method has high accurate, which can be used for quality control of this series of products. The overall microbiological test results of this series of products are good. However, it's necessary for enterprises to promptly identify and assess the quality risks in the production process to fully ensure the drug safety.

**【Keywords】** Vitamin C Yinqiao preparation; Microbial limit test; Method suitability test; Analysis of microbial pollution situation

维C银翘系列制剂有片剂、颗粒剂、胶囊剂（包括硬胶囊、软胶囊）3个剂型，由山银花或金银花、连翘、牛蒡子、甘草等10味中药加入对乙酰氨基酚、马来酸氯苯那敏、维生素C3味化学药加工而成的复方制剂，临床主要用于治疗流行性感冒引起的发热、头疼、咳嗽、口干、咽喉疼痛等<sup>[1-4]</sup>。在2022年国家药品抽检工作中，贵州省食品药品检验所承担了维C银翘系列制剂品种评价性抽检任务，考虑到药品污染微生物的控制是保障药品安全性的重要措施<sup>[5]</sup>，故开展了微生物学检验的研究工作。目前尚未见维C银翘颗粒、维C银翘胶囊微生物限度方法的相关文献报道，有几则《中国药典（2005年版）》和《中国药典（2010年版）》建立维C银翘片微生物限度方法的报道<sup>[6-8]</sup>，但考虑《中国药典（2015年版）》对于微生物限度检查方法的技术要求有了较大的修订，参考价值有限，故参照《中国药典（2020年版）》四部通则1105、1106、1107要求，对该系列产品开展了微生物限度检验与方法适用性研究工作，并对制剂的污染状况开展分析，保证检验质量并为其监管提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要仪器

NU-425-400E型生物安全柜（美国NuAire）；KB240型低温恒温培养箱、BF260型电热恒温培养箱购自德国Binder；VITEK MS基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱仪（法国梅里埃）；GR85DA型立式自动压力蒸汽灭菌器[致微（厦门）仪器有限公司]；ME2002型电子天平（瑞士梅特勒-托利多）；HTY HOMO761型匀浆仪（浙江泰林生物技术股份有限公司）。

### 1.2 主要药品与试剂

胰酪大豆胨液体培养基（tryptic soy broth, TSB, 批号：21061785）、胰酪大豆胨琼脂培养基

（tryptic soy agar, TSA, 批号：20122516）、麦康凯液体培养基（批号：2107216）均购自北京陆桥技术股份有限公司；沙氏葡萄糖琼脂培养基（sabouraud dextrose agar, SDA, 批号：210322）均购自北京三药科技有限公司；麦康凯琼脂培养基（青岛海博生物技术有限公司，批号：20220122）；质谱样品处理基质溶液（法国梅里埃，批号：20220907）。

维C银翘片：涉及来自贵州、广西、云南、湖北、江西、广东、宁夏、新疆、甘肃、四川等省区21家企业生产的共173批次；维C银翘胶囊：胶囊涉及广西3家企业共16批，软胶囊涉及广东1家共3批；维C银翘颗粒：涉及广西3家企业生产的共20批次。以上均为全国28个省市相应机构依据2022年国家评价性抽验要求抽样提供。

### 1.3 菌种

黑曲霉 [编号：CMCC(F)98003]、枯草芽孢杆菌 [编号：CMCC(B)63501]、白色念珠菌 [编号：CMCC(F)98001]、金黄色葡萄球菌 [编号：CMCC(B)26003]、铜绿假单胞菌 [编号：CMCC(B)10104]、大肠埃希菌 [编号：CMCC(B)44102] 均购自中国食品药品检定研究院；大肠埃希菌（上海宝录生物科技有限公司，编号：ATCC8739）。

### 1.4 方法

#### 1.4.1 法定检验

按照企业提供的微生物检验方法资料，结合《中国药典（2020年版）》四部通则1105、1106、1107<sup>[9]</sup>，对212批样品开展需氧菌总数（total aerobic microbial count, TAMC）、霉菌和酵母菌总数（total yeasts and molds count, TYMC）、大肠埃希菌3个项目的微生物限度检查，TAMC均不大于 $10^3$  cfu/g，TYMC均不大于 $10^2$  cfu/g，均不能检出大肠埃希菌（1g）。

### 1.4.2 探索性研究

①供试液制备。取两个以上最小包装的样品 10 g, 加入 pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液至 100 mL, 45 °C 水浴振摇至完全溶解(胶囊、软胶囊、颗粒)或用匀浆仪使其完全溶解(片剂), 制成 1:10 的供试液。各取上述 1:10 供试液 10 mL, 加入 pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液分别至 20、50、100 mL, 混匀, 分别制备成 1:20、1:50、1:100 的供试液。

②菌液制备。按照《中国药典(2020 年版)》四部通则 1105、1106 项下<sup>[9]</sup>菌液制备的要求和相关操作规范进行, 取上述金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、枯草芽孢杆菌、白色念珠菌和黑曲霉试验菌株分别用 TSB 进行逐级稀释, 制成不大于 10<sup>4</sup> cfu/mL 的菌悬液作为计数方法适用性检查菌液, 同法取大肠埃希菌制成不大于 10<sup>3</sup> cfu/mL 的菌悬液作为控制菌检查菌液, 且所加菌悬液浓度符合加入体积不大于供试液体积的 1% 的要求。

③计数方法适用性试验<sup>[9]</sup>。综合企业提供原方法、抽样批次、文献报道<sup>[10-15]</sup>, 选取反映抑菌性强、抽样批次占比大的样品开展预试验, TAMC 选取金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、铜绿假单胞菌作为试验菌, TYMC 选白色念珠菌、黑曲霉, 每个企业选取 1 批产品。片剂选取 12 家企业产品开展预试验, TAMC 对应的供试液稀释倍数为 1:10、1:20、1:50、1:100, TYMC 为 1:10、1:20。颗粒剂 2 家, TAMC 对应的供试液稀释倍数为 1:10、1:20, TYMC 为 1:10、1:20。胶囊剂 3 家, 其中硬胶囊 2 家, TAMC 对应的供试液稀释倍数为 1:10、1:20、1:50, TYMC 为 1:10、1:20; 软胶囊 1 家, TAMC、TYMC 对应的供试液稀释倍数均为 1:10。分组情况如下: 试验组: 将菌液加入供试液中, 使每 1 mL 供试液中的加菌量不大于 100 cfu, 混匀。供试品对照组: 取供试液, 以 pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液代替菌液同试验组操作。菌液对照组: 取 pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液替代供试液, 同试验组操作。以上 3 组, 均取 1 mL 混合液入平皿(直径 90 mm), TAMC 对应组加入 20 mL TSA 培养基, TYMC 对应组加入 20 mL SDA 培养基, 分别放至 32.5 °C 和 22.5 °C 培养箱培养 3 d 和 5 d, 计数记录。

④回收比值计算<sup>[9]</sup>。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, 若回收率比值在 0.5~2 范围内, 认为该方法适用于样品 TAMC、TYMC。

⑤控制菌检查方法适用性试验。分组: 试验组: 取 1:10 供试液 10 mL, 接种至 100 mL TSB 中, 加入 0.1 mL 大肠埃希菌菌液(不大于 100 cfu), 吸取 32.5 °C 下培养 18 h 的培养液 10 mL, 加入 100 mL 麦康凯液体培养基中, 置于 43 °C 下培养 24 h 后, 于麦康凯琼脂培养基上划线分离, 32.5 °C 培养 18 h 后, 观察菌落形态, 有典型菌落生长, 则判定方法适用。供试品对照组: 不加菌液, 其余操作同试验组。阴性对照组: 以 TSB 代替供试液, 其余操作同试验组。

⑥污染菌鉴定。挑取 TAMC、TYMC 检验环节生长菌落, 在 TSA 平板上划线分离纯化后于 32.5 °C 培养 24 h; 同步将大肠埃希菌(编号: ATCC 8739)划线于血平板后于 32.5 °C 培养 24 h。用 1 μL 无菌塑料接种环挑取少量培养好的单菌落, 均匀涂于靶板点位内, 立即加 1 μL CHCA 基质, 每株菌涂于相邻 2 个点位内, 同时在靶板中心的小点位内涂大肠埃希菌(编号: ATCC 8739)作为校准菌株同法操作。利用 VITEK MS 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱仪“IVD”模式下选择“双点位”开展鉴定, 通过仪器配备的 MyLa 数字化管理平台查看分析鉴定结果; 当显示双点位结果的可信度均为绿色方格标识(即可信度为 60.0%~99.9%)时, 则留存鉴定结果开展进一步分析。

⑦同源性分析。在 VITEK MS 的“RUO”模式下, 利用 SARAMIS Premiu 软件中的 Taxonomy 功能对核糖体蛋白质特征性标志物谱图鉴定结果开展聚类分析, 实现对某 2 家企业产品中检出的 4 株蜡样芽孢杆菌群的同源性分析。

## 2 结果

### 2.1 计数方法适用性试验

#### 2.1.1 预试验结果

11 家企业的维 C 银翘片计数方法回收比值情况见表 1, 当供试液稀释倍数为 1:10 时, 对金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌有抑制作用的企业产品分别为 7 家和 6 家, 其中贵州 A 公司、广东 A 公司、广西 C 公司和湖北 A 公司 4 家企业产品对两株菌均有抑制; 当供试液稀释倍数为 1:20 时, 仍有贵州 A 公司、广东 A 公司、湖北

A 公司和新疆 A 公司 4 家企业对金黄色葡萄球菌有抑制作用, 而仅有广西 C 公司产品对枯草芽孢杆菌仍存在抑制; 当供试液稀释倍数为 1:50 时, 能消除贵州 A 公司、广东 A 公司、湖北 A 公司、新疆 A 公司产品成分对金黄色葡萄球菌的抑制,

同时可消除对枯草芽孢杆菌生长的影响; 当供试液稀释倍数为 1:10 时, 也不会对白色念珠菌、黑曲霉的生长带来明显影响。因此选择 1:50、1:10 统一开展维 C 银翘片 TAMC、TYMC 方法适用性试验。

表1 维C银翘片计数方法适用性试验预试验回收比值

Table 1. The recovery ratio of pre-application test of the counting method for vitamin C Yinqiao tablets

项目	试验菌	供试液稀释倍数	回收比值										
			贵州A公司	云南A公司	广西A公司	云南B公司	广西B公司	广东A公司	广西C公司	广西D公司	湖北A公司	新疆A公司	江西A公司
TAMC试验	金黄色葡萄球菌	1:10	0.38	0.78	0.61	0.47	0.59	0.22	0.44	0.79	0.24	0.08	0.46
		1:20	0.46	0.83	0.74	0.70	0.88	0.49	0.65	1.10	0.46	0.42	0.61
		1:50	0.79	0.88	0.90	0.93	0.80	0.73	0.86	1.20	0.65	0.71	0.90
		1:100	1.10	0.90	0.92	1.00	0.93	0.86	0.91	0.97	0.83	0.85	1.10
	枯草芽孢杆菌	1:10	0.44	0.77	0.48	0.56	0.44	0.42	0.41	0.77	0.35	0.71	0.68
		1:20	0.68	0.80	0.53	0.71	0.69	0.64	0.48	0.98	0.51	0.80	0.90
		1:50	0.81	0.86	0.80	0.90	0.93	1.02	0.73	0.96	0.71	0.89	0.97
		1:100	0.86	0.88	0.93	0.93	0.90	0.98	0.88	0.80	0.79	0.93	1.00
	铜绿假单胞菌	1:10	0.80	0.69	0.65	0.77	0.61	0.66	0.78	0.80	0.86	0.84	0.78
		1:20	0.88	0.75	0.70	0.81	0.73	0.86	0.88	0.93	0.88	0.88	0.90
		1:50	0.93	0.86	0.86	0.92	0.88	0.88	1.10	1.20	0.98	1.00	0.93
		1:100	0.90	0.93	0.90	0.89	0.97	0.80	0.97	1.20	0.91	0.98	0.98
TYMC试验	白色念珠菌	1:10	0.87	0.80	0.90	0.87	0.95	1.10	1.00	1.00	1.00	0.77	0.87
		1:20	0.83	0.96	1.20	0.83	1.20	1.20	0.99	0.95	0.89	0.79	0.91
	黑曲霉	1:10	1.10	0.81	0.78	1.00	0.88	0.75	0.95	0.88	1.20	1.00	0.98
		1:20	1.10	0.93	0.86	1.20	1.10	0.88	0.97	1.10	1.10	1.10	1.00

由表2可知, 软胶囊的抑菌性较弱, 1:10 供试液即可保证计数方法的回收率达到《中国药典(2020年版)》规定。硬胶囊对金黄色葡萄球菌的抑制作用更为明显, 当供试液为 1:50、1:10 时,

可用于开展 TAMC、TYMC 的统一计数方法试验。颗粒剂的预试验回收比值见表3, 广西 E 公司产品对枯草芽孢杆菌有一定抑制, 故确定以 1:20、1:10 作为该剂型计数方法的供试液稀释级。

表2 维C银翘胶囊计数方法适用性试验预试验回收比值

Table 2. The recovery ratio of pre-application test of the counting method for vitamin C Yinqiao capsules

项目	试验菌	供试液稀释倍数	回收比值		
			广西G公司(硬胶囊)	广西H公司(硬胶囊)	广东D公司(软胶囊)
TAMC试验	金黄色葡萄球菌	1:10	0.42	0.11	0.59
		1:20	0.48	0.35	—
		1:50	1.00	0.75	—
	枯草芽孢杆菌	1:10	0.61	0.38	1.10
		1:20	0.88	0.72	—
		1:50	1.00	0.91	—
	铜绿假单胞菌	1:10	0.92	1.10	0.76
		1:20	1.10	1.10	—
		1:50	1.20	1.20	—
TYMC试验	白色念珠菌	1:10	0.65	0.78	0.98
		1:20	0.86	0.83	—
	黑曲霉	1:10	0.78	0.85	1.30
		1:20	1.04	1.17	—

注: “—”表示未进行该试验。



表3 维C银翘颗粒计数方法适用性试验预试验回收比值

Table 3. The recovery ratio of pre-application test of the counting method for vitamin C Yinqiao granules

试验项目	试验菌	供试液稀释倍数	回收比值	
			广西C公司	广西E公司
TAMC试验	金黄色葡萄球菌	1:10	1.00	0.68
		1:20	0.99	0.73
		1:50	—	—
	枯草芽孢杆菌	1:10	0.95	0.30
		1:20	0.90	0.67
		1:50	—	—
	铜绿假单胞菌	1:10	1.00	0.65
		1:20	0.98	0.88
		1:50	—	—
TYMC试验	白色念珠菌	1:10	0.85	0.81
		1:20	1.10	0.90
	黑曲霉	1:10	1.20	1.00
		1:20	1.20	0.98

注：“—”表示未进行该试验。

2.1.2 正式试验结果

表4~表6分别为维C银翘系列片剂、胶囊剂和颗粒剂的计数方法适用性试验回收比值，当供试液稀释倍数分别为1:50、1:10时，均适用

于片剂、硬胶囊TAMC、TYMC检验。软胶囊可用1:10供试液开展计数检验。以1:20、1:10供试液分别开展颗粒剂TAMC、TYMC检验，适用性佳。

表4 20个企业生产维C银翘片计数方法适用性试验回收比值

Table 4. The recovery ratio of application test of the counting method for vitamin C Yinqiao tablets from 20 enterprises

企业	批号	回收比值				
		金黄色葡萄球菌	枯草芽孢杆菌	铜绿假单胞菌	白色念珠菌 (TAMC/TYMC)	黑曲霉 (TAMC/TYMC)
贵州A公司	20210122	0.98	1.10	0.88	0.83/0.87	1.10/1.10
	20210830	0.87	0.93	0.88	0.91/0.98	1.10/1.10
	20210520	0.84	0.95	0.90	1.10/1.00	1.10/1.10
贵州B公司	220301	0.81	0.73	1.10	0.79/0.85	0.84/1.10
	220303	0.87	0.89	1.10	0.91/0.84	0.86/1.10
	220304	0.77	0.82	1.00	0.75/0.70	0.84/0.96
云南A公司	210409	1.10	0.99	0.95	0.87/0.83	1.20/1.00
	210412	0.86	0.89	0.84	0.89/0.87	1.30/0.91
	210604	0.87	0.91	0.80	0.71/1.00	1.20/0.98
云南B公司	210801	0.82	0.95	0.95	0.80/0.96	0.82/0.94
	211203	0.77	1.10	0.80	0.80/0.87	1.10/0.98
	220204	0.93	0.98	0.91	1.00/0.79	1.10/1.10
四川A公司	201001	0.88	1.10	0.96	1.10/0.71	1.10/1.24
	201001	1.10	1.10	1.00	0.97/0.70	1.00/1.10
	201001	0.94	1.20	0.76	0.98/0.80	1.10/1.10
宁夏A公司	210910	0.95	0.95	0.90	1.10/0.88	1.10/1.10
	210805	0.76	0.86	0.87	0.90/1.10	1.10/1.40
	211009	0.84	0.98	0.79	0.99/1.20	1.00/1.10

续表4

企业	批号	回收比值				
		金黄色葡萄球菌	枯草芽孢杆菌	铜绿假单胞菌	白色念珠菌 (TAMC/TYMC)	黑曲霉 (TAMC/TYMC)
湖北A公司	210201	0.83	0.70	1.10	0.86/1.00	1.10/1.00
	220304	0.59	0.68	1.00	0.78/1.00	1.10/1.20
	220203	0.81	0.72	0.97	0.92/1.10	1.10/1.00
湖北B公司	210401	0.76	0.92	1.10	0.58/0.88	0.95/1.20
	210401	0.73	0.80	1.00	1.00/0.76	1.00/0.89
	210401	0.78	0.81	1.10	0.91/0.83	0.82/0.92
甘肃A公司	20211101	0.82	0.95	0.96	0.81/0.91	1.00/0.96
	20211101	0.99	1.50	1.20	0.84/0.88	1.00/0.99
	20211101	0.87	1.00	1.10	0.73/0.80	1.10/1.20
新疆A公司	20220135	0.85	0.98	0.93	0.74/0.54	1.20/1.40
	20220135	0.80	0.98	0.82	0.87/0.77	1.10/1.30
	20211205	0.75	0.98	0.96	0.87/0.71	1.10/1.30
广东A公司	211005	0.84	1.10	1.10	1.10/0.98	0.72/0.74
	211201	0.81	1.00	1.20	1.20/1.10	0.88/0.75
	210901	0.73	0.93	0.97	1.00/1.30	0.92/0.88
广东B公司	20012	0.91	1.10	1.30	0.98/0.93	0.88/0.75
	21002	0.94	1.10	1.30	0.89/1.20	0.94/0.72
	21003	0.73	0.89	1.10	0.95/0.94	1.10/0.74
广东C公司	20210801	0.78	0.74	1.20	0.79/0.72	0.97/1.30
	20210801	0.76	0.53	1.10	0.74/0.69	0.87/0.84
	20201202	0.81	0.90	1.10	0.88/0.85	0.95/1.10
广西A公司	211102	0.89	0.95	0.85	0.90/1.20	0.83/0.74
	211202	0.81	1.00	1.20	0.77/1.50	0.85/0.89
	210801	1.00	1.00	1.10	0.89/1.20	0.91/0.76
广西B公司	210801	0.91	0.91	1.30	0.93/1.20	1.10/0.88
	201201	0.90	0.94	1.10	0.97/1.30	1.00/0.71
	211101	0.98	1.00	1.20	0.98/1.30	1.10/0.64
广西C公司	211001	0.91	0.94	0.99	0.99/1.00	0.97/0.95
	210803	0.91	0.84	0.85	1.00/0.90	0.92/1.00
	210802	0.70	0.84	0.88	1.10/0.98	1.00/1.00
广西D公司	210301	1.00	1.10	1.30	0.95/1.00	1.10/0.88
	211101	0.99	0.99	1.20	1.10/1.10	0.82/0.78
	211201	0.81	0.96	1.20	0.87/1.00	0.91/0.63
广西E公司	211103	0.94	0.99	1.10	1.20/1.00	0.96/1.20
	220101	0.86	0.89	0.98	1.10/1.00	1.10/0.98
	220103	0.95	1.00	0.84	1.00/0.83	0.85/0.94
广西F公司	211202	0.94	0.91	1.10	0.70/0.78	1.00/1.00
	211202	0.82	1.10	1.20	0.86/0.88	1.10/1.20
	211202	0.89	0.80	0.91	0.78/0.74	0.75/0.99
江西A公司	210906	0.67	0.83	0.95	1.00/0.88	1.20/1.30
	211213	0.78	1.10	0.70	0.91/0.87	0.98/1.10
	211212	0.82	1.30	0.98	0.81/0.90	1.00/1.10

表5 3个企业生产维C银翘胶囊计数方法适用性试验回收比值  
Table 5. The recovery ratio of application test of the counting met

胶囊剂	企业	批号	回收比值				
			金黄色葡萄球菌	枯草芽孢杆菌	铜绿假单胞菌	白色念珠菌 (TAMC/TYMC)	黑曲霉 (TAMC/TYMC)
硬胶囊	广西G公司	211202	0.99	1.10	1.00	0.93/0.91	0.77/0.87
		220201	0.94	0.92	1.20	0.96/0.69	1.10/0.72
		210202	1.00	1.20	1.00	0.85/0.69	1.20/0.83
	广西H公司	210201	0.75	0.92	0.93	0.96/0.89	1.20/0.83
		220301	1.00	0.90	1.10	0.90/0.79	1.30/0.96
		211201	1.00	0.92	0.93	0.80/0.85	0.89/0.74
软胶囊	广东D公司	211101	0.85	0.80	0.75	0.87/0.97	0.82/0.81
		211202	0.92	0.70	0.81	0.80/0.91	0.70/0.81
		211203	1.00	0.61	0.98	0.83/0.88	0.91/0.81

表6 3个企业生产维C银翘颗粒计数方法适用性试验回收比值  
Table 6. The recovery ratio of application test of the counting method for vitamin C Yinqiao granules from 3 enterprises

企业	批号	回收比值				
		金黄色葡萄球菌	枯草芽孢杆菌	铜绿假单胞菌	白色念珠菌 (TAMC/TYMC)	黑曲霉 (TAMC/TYMC)
广西C公司	210802	1.40	1.10	0.81	1.10/1.00	1.40/1.40
	210803	1.20	0.95	0.80	0.96/1.00	1.20/1.20
	211001	0.99	0.96	0.94	0.88/1.00	1.10/1.40
广西G公司	210703	1.50	1.00	0.90	0.96/1.00	1.00/0.72
	220302-1	1.10	1.00	1.00	0.98/0.87	0.95/0.96
	220302-2	1.20	1.10	0.98	0.98/0.90	0.91/0.87
广西E公司	210306	0.89	1.10	1.10	0.92/0.80	0.82/1.10
	220303	0.95	0.74	1.10	0.77/1.10	1.10/1.00
	220301	0.99	0.80	0.83	1.10/1.00	0.95/0.94

## 2.2 控制菌检查适用性试验结果

每批次产品试验组均能检出典型的阳性对照菌，供试品对照组、阴性对照组均无菌生长，说明将 10 mL 1 : 10 供试液接种至 100 mL TSB，按《中国药典（2020 年版）》开展后续培养，大肠埃希菌的检验方法可行。

## 2.3 污染状况分析

### 2.3.1 制剂微生物生长情况

212 批样品中，均未检出大肠埃希菌，TAMC、TYMC 结果统计见表 7 和表 8，片剂生

长情况为：TAMC 生长为 32 批次，占总抽样 18.5%，其中菌数小于 100 cfu/g 占比最大，为 59.4%；TYMC 生长均小于 20 cfu/g。21.1% 的胶囊剂存在需氧菌、霉菌和酵母菌生长的情况，其中 TAMC 100~500 cfu/g 产品占有菌生长剂型的比例为 75.0%，较片剂更大；TYMC 共 4 批长菌，结果均在 20~50 cfu/g。颗粒剂 TAMC 有菌生长的情况占该剂型总抽样数 40.0%，但结果均不大于 100 cfu/g；TYMC 有菌生长占该剂型总抽样数的 10.0%，其中 20~50 cfu/g 和 50~100 cfu/g 各 1 批。

表7 TAMC结果统计  
Table 7. Statistics of TAMC results

菌数 (cfu/g)	片剂		胶囊剂		颗粒剂		合计 (批)
	批次	占比 (%)	批次	占比 (%)	批次	占比 (%)	
10~100	19	59.4	1	25.0	8	100.0	28
100~500	12	37.5	3	75.0	0	—	15
500~2 000	1	3.1	0	—	0	—	1
合计 (批)	32	100.0	4	100.0	8	100.0	44
共抽检样品 (批)	173	18.5	19	21.1	20	40.0	—

注：“—”表示无相关数据。

表8 TYMC结果统计

Table 8. Statistics of TYMC results

菌数 (cfu/g)	片剂		胶囊剂		颗粒剂		合计 (批)
	批次	占比 (%)	批次	占比 (%)	批次	占比 (%)	
20~50	0	—	4	100.0	1	50.0	5
50~100	0	—	0	—	1	50.0	1
合计 (批)	0	—	4	100.0	2	100.0	6
共抽检样品 (批)	173	—	19	21.1	20	10.0	—

注：“—”表示无相关数据。

### 2.3.2 污染菌鉴定结果分析

利用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱仪对TAMC、TYMC平板上生长的菌落开展鉴定，双点位结果一致且可信度均为绿色方格标识（即可信度为60.0%~99.9%）的鉴定情况见表9。总体来看芽孢杆菌属的检出频次较大，共有30次；其中枯草芽孢杆菌/解淀粉芽孢杆菌/死谷芽孢杆菌的检出频次为15次（由于上述3个种的核糖体蛋白质特征性标志物谱图较为接近，因此无法通过基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱仪将它们鉴定到种；因同样原因无法鉴定到种的还有高地芽孢杆菌和短小芽孢杆菌）。由鉴定结果可看出，M公司和N公司产品检出的蜡样芽孢杆菌

群，Q公司检出的布鲁氏杆菌属中的某些种，危害度较大<sup>[16-18]</sup>。

### 2.3.3 蜡样芽孢杆菌群源性分析

据“2.3.2”项结果，N公司有1批样品TAMC平板上检出蜡样芽孢杆菌群，M公司亦有3批样品（不同生产批号，抽样地为不同省份）TAMC环节收集到的菌落中检出蜡样芽孢杆菌群。对上述4株菌开展了源性分析，结果见表10和图1。与N公司检出菌相比，M公司产品检出的3株菌的源性更高、对应产品生产时间为2021年9~10月，提示该段时间产品受到源性污染的概率较大。

表9 污染菌鉴定结果与频次

Table 9. Identification results and frequency of contaminated bacteria

生产企业	属	具体结果	频次	总频次
云南A公司	芽孢杆菌属	枯草芽孢杆菌/解淀粉芽孢杆菌/死谷芽孢杆菌	7	15
广东A公司	芽孢杆菌属	枯草芽孢杆菌/解淀粉芽孢杆菌/死谷芽孢杆菌	2	
广西A公司	芽孢杆菌属	枯草芽孢杆菌/解淀粉芽孢杆菌/死谷芽孢杆菌	2	
贵州A公司	芽孢杆菌属	枯草芽孢杆菌/解淀粉芽孢杆菌/死谷芽孢杆菌	2	
江西A公司	芽孢杆菌属	枯草芽孢杆菌/解淀粉芽孢杆菌/死谷芽孢杆菌	1	
广西E公司	芽孢杆菌属	枯草芽孢杆菌/解淀粉芽孢杆菌/死谷芽孢杆菌	1	
M公司	芽孢杆菌属	蜡样芽孢杆菌群	3	4
N公司	芽孢杆菌属	蜡样芽孢杆菌群	1	
广东A公司	芽孢杆菌属	地衣芽孢杆菌	1	2
江西A公司	芽孢杆菌属	地衣芽孢杆菌	1	
广西A公司	芽孢杆菌属	短芽孢杆菌属某些种	1	2
广东B公司	芽孢杆菌属	短芽孢杆菌属某些种	1	
广东A公司	芽孢杆菌属	巨大芽孢杆菌	2	2
广西A公司	芽孢杆菌属	西尔维斯单芽孢杆菌	2	2
广西A公司	芽孢杆菌属	环状芽孢杆菌	1	1
新疆A公司	芽孢杆菌属	高地芽孢杆菌/短小芽孢杆菌	1	1
广西G公司	芽孢杆菌属	崛越氏芽孢杆菌	1	1
广西A公司	短杆菌属	涅氏短状杆菌	1	1
广西A公司	肠杆菌属	霍氏肠杆菌	1	1
广西C公司	纤维菌属	纤维化纤维菌	1	1
Q公司	布鲁氏杆菌属	布鲁氏杆菌属某些种	1	1
广西E公司	肠球菌属	屎肠球菌	1	1
云南A公司	诺卡菌属	核苷酸诺卡菌	1	1



表10 蜡样芽孢杆菌群来源样品信息

Table 10. Sample information about *Bacillus cereus* group

生产企业	序号	检品编号	生产批号	TAMC (cfu/g)	TYMC (cfu/g)	鉴定结果
N公司	1	YG20220185	210401	400	<10	蜡样芽孢杆菌群
M公司	2	YG20220052	211005	50	<10	
	3	YG20220197	210902	35	<10	
	4	YG20220137	210901	35	<10	

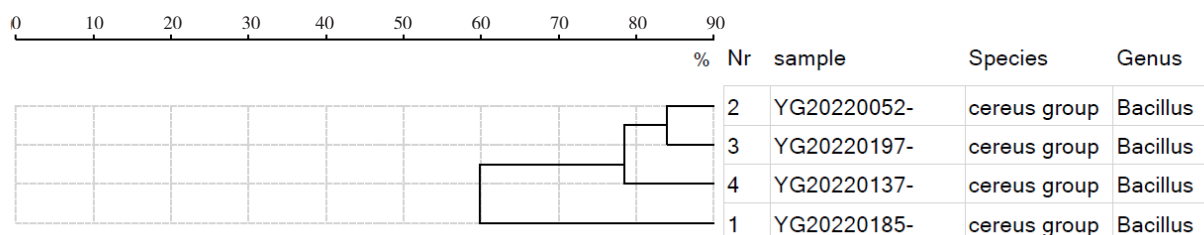


图1 4株检出蜡样芽孢杆菌群MALDI-TOF-MS同源性分析结果

Figure 1. Homology analysis for 4 strains of *Bacillus cereus* group by MALDI-TOF-MS

### 3 讨论

该系列制剂涉及的生产企业较多，通过统一微生物限度检查方法，可为监管技术支撑提供参考。其中的主要成分金银花、山银花对金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、铜绿假单胞菌等均有较好的抑制性，故选取上述3株菌对不同剂型产品开展微生物计数方法适用性预试验。在开展预试验时发现，与其他公司产品相比，由贵州A公司、广东A公司、广西C公司及湖北A公司生产的片剂与由广西H公司生产的硬胶囊均对金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌存在较明显抑制，这可能与企业生产用药材的产地差异有一定关系<sup>[19]</sup>，可以此作为切入点开展研究。

为更深入了解该系列制剂的污染状况，对TAMC、TYMC环节所生长的菌落开展鉴定。检出频次最高的芽孢杆菌属可能主要来源于物料和生产环节<sup>[20]</sup>。需特别注意的是，检出了布鲁氏杆菌属、蜡样芽孢杆菌群等危害性可能较大的菌株。提示企业不能仅依赖微生物限度检查结果评估产品微生物污染状态，还需及时分析日常检验数据趋势与收集菌株、更深入发掘生产过程控制风险点。

通过同源性分析发现，M公司3批产品中检出的蜡样芽孢杆菌群菌株同源性较高；考虑抽样地不同，加之3批产品生产日期较为接近，提示由生产环节带入污染的概率较大。蜡样芽孢杆菌会引起呕吐、腹泻、脓毒血症等，甚至会导致死

亡<sup>[16]</sup>，为常见的不可接受微生物<sup>[17]</sup>。但近年研究发现部分蜡样芽孢杆菌具有益生功能<sup>[21]</sup>，对于此类菌群，可考虑利用毒力基因测试开展危害性评估<sup>[22-23]</sup>。此外，不同菌株产肠毒素数量存在一定差异<sup>[16]</sup>，需要开展定量风险评估<sup>[24]</sup>。N公司虽仅有1批产品检出蜡样芽孢杆菌群，但由于负载较大（TAMC结果为400 cfu/g），需要及时研判质量风险。此部分结果提示上述企业应关注品种计数检验情况，更大范围地考察蜡样芽孢杆菌群的检出频次和污染程度；同时从生产环节的原辅包、人员、环境等方面开展追溯排查，尽可能从源头控制微生物污染，充分保障患者用药安全。

目前，已有多版药典将具有潜在危害的微生物收载并定义为“不可接受微生物”<sup>[25]</sup>，国内关于“不可接受微生物”评估的案例较少<sup>[25-28]</sup>，提示企业在生产过程中应重视检出的非药典规定控制菌，结合鉴定结果、产品属性、工艺特性、患者人群、用药途径、生产过程等因素<sup>[29]</sup>制定合理科学的评估与控制策略。

### 参考文献

- 1 中国药典 2020 年版. 一部 [S]. 2020: 1702.
- 2 国家药品监督管理局. 国家药品标准. WS-11251(ZD-1251)-2002-2012Z[S]. 2012.
- 3 国家食品药品监督管理局. 国家药品标准. YBZ10232009[S]. 2009.
- 4 周亚菁, 沈于兰. UPLC 法测定维 C 银翘片中 6 种有

- 效成分的含量[J]. 药学与临床研究, 2021, 29(2): 106–108. [Zhou YJ, Shen YL. Determination of six constituents in vitamin C Yinqiao tablets by UPLC[J]. Pharmaceutical and Clinical Research, 2021, 29(2): 106–108.] DOI: [10.13664/j.cnki.pcr.2021.02.006](https://doi.org/10.13664/j.cnki.pcr.2021.02.006).
- 5 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. [Hu CQ. Current situation and trend in pharmaceutical microbial control system[J]. Chinese Journal of Modern Applied Pharmacy, 2021, 38(5): 513–519.] DOI: [10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2021.05.001](https://doi.org/10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2021.05.001).
- 6 李俊, 张丽梅. 6种中成药微生物限度检查方法验证[J]. 医药导报, 2010, 29(9): 1222–1223. [Li J, Zhang LM. Validation of microbial limit test methods for 6 kinds of traditional Chinese patent medicines[J]. Herald of Medicine, 2010, 29(9): 1222–1223.] DOI: [10.3870/yydb.2010.09.046](https://doi.org/10.3870/yydb.2010.09.046).
- 7 潘雯, 关倩明, 林玲. 7种具有抑菌成分中成药的微生物限度检查方法验证[J]. 广东药学院学报, 2012, 28(6): 623–627. [Pan W, Guan QM, Lin L. Validation of the microbial limit test methods for seven kinds of Chinese patent medicine with antibacterial ingredients[J]. Journal of Guangdong Pharmaceutical University, 2012, 28(6): 623–627.] DOI: [10.3969/j.issn.1006-8783.2012.06.010](https://doi.org/10.3969/j.issn.1006-8783.2012.06.010).
- 8 董琪, 赵楠. 维C银翘片微生物限度检查方法的建立[J]. 中国中医药现代远程教育, 2012, 10(21): 159–160. [Dong Q, Zhao N. Validation of method for microbial in the test of Vit C Yinqiao Tablets[J]. Chinese Medicine Distance Education of China, 2012, 10(21): 159–160.] DOI: [10.3969/j.issn.1672-2779.2012.21.111](https://doi.org/10.3969/j.issn.1672-2779.2012.21.111).
- 9 中国药典 2020 年版. 四部[S]. 2020: 160–171.
- 10 张豫丹, 许自成, 李俊领, 等. 绿原酸的提取及其抑菌作用研究进展[J]. 保鲜与加工, 2022, 22(2): 113–120. [Zhang YD, Xu ZC, Li JL, et al. Research progress on extraction and antibacterial effects of chlorogenic acid[J]. Storage and Process, 2022, 22(2): 113–120.] DOI: [10.3969/j.issn.1009-6221.2022.02.017](https://doi.org/10.3969/j.issn.1009-6221.2022.02.017).
- 11 罗江南. 山银花总皂苷部位抗菌抗炎作用及挥发性成分研究[D]. 南昌: 江西中医药大学, 2021. DOI: [10.27180/d.cnki.gjzxc.2021.000036](https://doi.org/10.27180/d.cnki.gjzxc.2021.000036).
- 12 王志辉, 周新茹, 成惠珍, 等. 基于多元统计分析的山银花抗氧化与抑菌质量标志物预测[J]. 湖南中医药大学学报, 2022, 42(7): 1105–1111. [Wang ZH, Zhou XR, Cheng HZ, et al. Prediction of antioxidant and antibacterial quality markers of Flos Ionicerae based on multivariate statistical analysis[J]. Journal of Hunan University of Chinese Medicine, 2022, 42(7): 1105–1111.] DOI: [10.3969/j.issn.1674-070X.2022.07.009](https://doi.org/10.3969/j.issn.1674-070X.2022.07.009).
- 13 高倩, 张晓虎, 郭元园. 连翘精油-ε-pL-Nisin复合涂膜保鲜液配制[J]. 陕西农业科学, 2022, 68(1): 14–21. [Gao Q, Zhang XH, Guo YY. Preparation of film-coating preservation solution with forsythia essential oil-ε-pL-Nisin compound[J]. Shaanxi Journal of Agricultural Sciences, 2022, 68(1): 14–21.] DOI: [10.3969/j.issn.0488-5368.2022.01.005](https://doi.org/10.3969/j.issn.0488-5368.2022.01.005).
- 14 张梅, 李晓君, 成悦, 等. 植物源防腐剂的制备及抑菌机理研究[J]. 食品研究与开发, 2022, 43(1): 139–145. [Zhang M, Li XJ, Cheng Y, et al. A study on the preparation and antibacterial mechanism of plant-driven preservatives[J]. Food Research and Development, 2022, 43(1): 139–145.] DOI: [10.12161/j.issn.1005-6521.2022.01.020](https://doi.org/10.12161/j.issn.1005-6521.2022.01.020).
- 15 苏畅, 赵艳云, 冯媛, 等. 荆芥叶及穗的抗菌效果和成分分析[J]. 中国新药杂志, 2022, 31(11): 1103–1111. [Su C, Zhao YY, Feng Y, et al. Antibacterial effect and composition analysis of the leaves and spicas from Schizonepeta tenuifolia Briq[J]. Chinese Journal of New Drugs, 2022, 31(11): 1103–1111.] DOI: [10.3969/j.issn.1003-3734.2022.11.012](https://doi.org/10.3969/j.issn.1003-3734.2022.11.012).
- 16 谢伟岸, 吴日明, 段洁, 等. 2014–2019年岳阳市食源性蜡样芽胞杆菌的溶血素 hblA 与磷脂酶 C plc 基因特征分析[J]. 中国食品卫生杂志, 2024, 36(4): 478–485. [Xie WA, Wu RM, Duan J, et al. Genetic characterization analysis of hblA and plc genes of foodborne Bacillus cereus in Yueyang City from 2014 to 2019[J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2024, 36(4): 478–485.] DOI: [10.13590/j.cjfh.2024.04.018](https://doi.org/10.13590/j.cjfh.2024.04.018).
- 17 中国食品药品检定研究院. 中国药品检验标准操作规范(2019)版[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2019: 453.
- 18 高芬, 陈洪友, 屠丽红, 等. 2007–2020年上海市布鲁氏菌分离株分型方法研究[J]. 疾病监测, 2021, 36(7): 696–701. [Gao F, Chen HY, Tu LH, et al. Molecular characteristics of Brucella isolates in Shanghai, 2007–2020[J]. Disease Surveillance, 2021, 36(7): 696–701.] DOI: [10.3784/jbjc.202103080105](https://doi.org/10.3784/jbjc.202103080105).
- 19 王智颖, 荆绮, 曹宝瑞, 等. 不同产地、不同炮制方式连翘的主要化学成分含量及抗菌活性比较评价[J]. 湖南中医药大学学报, 2023, 43(11): 2041–2047. [Wang ZY, Jing Q, Cao BR, et al. Comparative evaluation on main chemical components content and antimicrobial

- activity of Lianqiao with different origins and processing methods[J]. *Journal of Hunan University of Chinese Medicine*, 2023, 43(11): 2041–2047.] DOI: [10.3969/j.issn.1674-070X.2023.11.017](https://doi.org/10.3969/j.issn.1674-070X.2023.11.017).
- 20 王喆. 某生物药品生产工艺各系统污染菌种库建立[D]. 山东烟台: 烟台大学, 2022. DOI: [10.27437/d.cnki.gytdu.2022.000563](https://doi.org/10.27437/d.cnki.gytdu.2022.000563).
- 21 李家旭, 贝翎, 袁晚晴, 等. 非致病性蜡样芽胞杆菌的益生功能与应用[J]. *现代食品科技*, 2023, 39(4): 1–9. [Li JX, Bei L, Yuan WQ, et al. Probiotic functions and applications of non-pathogenic *Bacillus cereus*[J]. *Modern Food Science and Technology*, 2023, 39(4): 1–9.] DOI: [10.13982/j.mfst.1673-9078.2023.4.0453](https://doi.org/10.13982/j.mfst.1673-9078.2023.4.0453).
- 22 卢晓芸, 施怡茹, 吴丽珠, 等. 89 株蜡样芽胞杆菌食品分离株携带毒力基因情况及 PFGE 分型研究[J]. *检验医学与临床*, 2023, 20(1): 18–21. [Lu XY, Shi YR, Wu LZ, et al. Study on virulence genes carrying status and PFGE typing of 89 strains of *Bacillus cereus* isolated from food[J]. *Laboratory Medicine and Clinic*, 2023, 20(1): 18–21.] DOI: [10.3969/j.issn.1672-9455.2023.01.005](https://doi.org/10.3969/j.issn.1672-9455.2023.01.005).
- 23 黄英. 芽孢杆菌代谢物细胞毒性检测方法及毒素类型研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2021. DOI: [10.27630/d.cnki.gznky.2021.000351](https://doi.org/10.27630/d.cnki.gznky.2021.000351).
- 24 汤晓召, 杨祖顺, 范璐, 等. 2012~2016 年云南省婴幼儿食品和即食食品中蜡样芽胞杆菌污染状况调查评估[J]. *食品安全质量检测学报*, 2017, 8(10): 3785–3789. [Tang XZ, Yang ZS, Fan L, et al. Investigation and assessment of *Bacillus cereus* contamination in infants and young children foods and ready-to-use foods in Yunnan from 2012 to 2016[J]. *Journal of Food Safety and Quality*, 2017, 8(10): 3785–3789.] DOI: [10.3969/j.issn.2095-0381.2017.10.015](https://doi.org/10.3969/j.issn.2095-0381.2017.10.015).
- 25 沈振, 徐晓洁, 任丽宏, 等. 中药颗粒剂中不可接受微生物的溯源分析和风险评估[J]. *药学研究*, 2022, 41(9): 584–610. [Shen Z, Xu XJ, Ren LH, et al. Traceability of objectionable microorganisms from a traditional Chinese medicine granule and risk assessment of contaminant microorganisms[J]. *Journal of Pharmaceutical Research*, 2022, 41(9): 584–610.] DOI: [10.13506/j.cnki.jpr.2022.09.005](https://doi.org/10.13506/j.cnki.jpr.2022.09.005).
- 26 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. [Gu M, Shen HY, Gu BR, et al. Review and discussion on risk assessment of cases with *Acinetobacter baumannii* detected in national drug sampling[J]. *Drug Standard of China*, 2020, 21(6): 487–493.] DOI: [10.19778/j.chp.2020.06.002](https://doi.org/10.19778/j.chp.2020.06.002).
- 27 沈海英, 鲍方名, 张国林, 等. 颗粒剂检出鲍曼不动杆菌复合菌及其危害性探讨[J]. *中国药品标准*, 2020, 21(4): 345–349. [Shen HY, Bao FM, Zhang GL, et al. Discussion on *Acinetobacter baumannii* complex bacteria in the granules and their harmfulness[J]. *Drug Standard of China*, 2020, 21(4): 345–349.] DOI: [10.19778/j.chp.2020.04.012](https://doi.org/10.19778/j.chp.2020.04.012).
- 28 林铁豪, 张帆, 朱欢敏, 等. 广东省中药饮片当归的微生物污染调查与风险分析[J]. *药物分析杂志*, 2024, 44(5): 859–865. [Lin TH, Zhang F, Zhu HM, et al. Investigation and risk analysis of microbial contamination in the Chinese herbal medicine *Angelicae Sinensis Radix* in Guangdong Province[J]. *Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis*, 2024, 44(5): 859–865.] DOI: [10.16155/j.0254-1793.2024.05.14](https://doi.org/10.16155/j.0254-1793.2024.05.14).
- 29 马英英, 王似锦, 马仕洪, 等. 非无菌药品中不可接受微生物的检验控制策略[J]. *中国药事*, 2023, 37(4): 389–395. [Ma YY, Wang SJ, Ma SH, et al. Testing control strategy of objectionable microorganisms in non-sterile products[J]. *Chinese Pharmaceutical Affairs*, 2023, 37(4): 389–395.] DOI: [10.16153/j.1002-7777.2023.04.004](https://doi.org/10.16153/j.1002-7777.2023.04.004).

收稿日期: 2024 年 06 月 12 日 修回日期: 2024 年 07 月 15 日  
本文编辑: 钟巧妮 李 阳