

基于基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱法的 3种中药材中污染菌的快速鉴定

白雯静*, 刘兴国, 田妮娜, 周斌, 刘荔

(兰州市食品药品检验所, 兰州 730050)

摘要: 目的 运用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱法(matrix assisted laser analytical ionization time of flight mass spectrometry, MALDI-TOF-MS)对9批中药材中相关污染菌进行快速鉴定, 考察其微生物污染情况。

方法 参照2015年版《中国药典》四部, 并结合MALDI-TOF-MS对分离出来的菌落进行鉴定。**结果** 甘草、黄芪、党参的lgTAMC(需氧菌总数, total aerobic microbial count)、lgTYMC(霉菌和酵母菌总数, total yeasts and molds count)分别为4.91~7.04、1.0~4.11, lgTB(耐热菌总数, total thermophilic bacteria count)为1.48~2.65, 而且经过100℃、30 min热处理后lgTAMC数值下降百分比均在50%以上。鉴定结果中显示污染概率最大的是成团泛菌、简单芽孢杆菌和地衣芽孢杆菌。**结论** 甘草、黄芪、党参药材中污染的微生物多为成团泛菌和芽孢杆菌, 在后期药材加工环节, 可以采用有针对性的、有效的处理方法, 从而避免由于原药材本身带来的不利影响。

关键词: 微生物污染; 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱法; 甘草; 黄芪; 党参

Rapid identification of microbial contamination for 3 kinds of Chinese medicinal herbs based on the matrix assisted laser analytical ionization time of flight mass spectrometry

BAI Wen-Jing*, LIU Xing-Guo, TIAN Ni-Na, ZHOU Bin, LIU Li

(Lanzhou Institute for Food and Drug Control, Lanzhou 730050, China)

ABSTRACT: Objective To quickly identify the related contamination bacteria of nine batches of Chinese medicinal materials by matrix assisted laser analytical ionization time of flight mass spectrometry(MALDI-TOF-MS), and investigate its microbial pollution situation. **Methods** The isolated colonies were identified in reference according to the 2015 edition of the *Chinese Pharmacopoeia* (Vol. 4) in combination with MALDI-TOF-MS. **Results** The lgTAMC (total aerobic microbial count) and lgTYMC (total yeasts and molds count) of *Glycyrrhizae radix et rhizoma*, *Astragali Radix* and *Codonopsis radix* were 4.91–7.04 and 1.0–4.11 respectively, while the lgTB (total thermophilic bacteria count) was 1.48–2.65. Besides, the numerical decline percentage of lgTAMC was above 50% after heat treatment at 100°C for 30 min. The identification results showed that the most probable contamination was *Pantoea agglomerans*, *Bacillus simplex* and *Bacillus licheniformis*. **Conclusions** The contaminated microorganisms in the medicinal materials of *Glycyrrhizae radix et rhizoma*, *Astragali Radix* and *Codonopsis radix* are mostly

基金项目: 甘肃省药品安全监管科研项目(2019GSMPA001)

Fund: Supported by the Drug Safety Supervision and Research Project of Gansu Province (2019GSMPA001)

*通信作者: 白雯静, 硕士, 主管药师, 主要研究方向为食品、药品微生物检验。E-mail: yd08joy@163.com

*Corresponding author: BAI Wen-Jing, Master, Pharmacist-In-Charge, Lanzhou Institute for Food and Drug Control, No.988, Pengjiaping Town, Qilihe District, Lanzhou 730050, China. E-mail: yd08joy@163.com

Pantoea agglomerans and *Bacillus*, and targeted and effective treatment methods can be adopted in the later medicinal material processing links to avoid adverse effects caused by the original medicinal materials.

KEY WORDS: microbial contamination; matrix assisted laser analytical ionization time of flight mass spectrometry; *Glycyrrhizae radix et rhizoma*; *Astragali Radix*; *Codonopsis radix*

0 引言

2015 年版《中国药典》^[1]对研粉口服用贵细饮片、直接口服及泡服饮片作了规定,需氧菌总数和霉菌及酵母菌总数并未做统一规定;仅对控制菌有详细限度要求[不得检出沙门菌(10 g)、耐胆盐革兰阴性菌应小于 10⁴ CFU (1 g)]。于 2020 年 12 月 30 日正式实施的 2020 版《中国药典》^[2]进一步做了规定(直接口服及泡服饮片):需氧菌总数(10⁵ CFU/g 或 CFU/mL)、霉菌和酵母菌总数(10³ CFU/g 或 CFU/mL);控制菌(不得检出大肠埃希菌(1 g 或 1 mL)、沙门菌(10 g 或 10 mL)、耐胆盐革兰阴性菌应小于 10⁴ CFU (1 g 或 1 mL)。《欧洲药典》^[3]《美国药典》^[4]《日本药典》^[5]在 2020 版《中国药典》颁布以前就对与中药饮片相当的植物药或生药做了明确的限度要求(包括需氧菌总数、霉菌及酵母菌总数、大肠埃希菌、沙门菌)。因此,2020 版《中国药典》的此项改革,也是为了更好地满足我国中药材市场国际化的需求。

甘草、黄芪和党参饮片均属于根类饮片。根类饮片一般微生物负载较高^[6-8](主要来源于土壤背景、后期施肥管理以及饮片加工环节等等)。综合微生物污染来源可知,对于饮片微生物污染情况的研究可以集中在加工前(原药材)、加工后(饮片)2 个方面。由此,对饮片加工前可能出现的微生物污染情况进行研究具有十分重要的意义:可以通过鉴定和分析,在饮片加工环节采取有目的性的、有效的措施对加工前污染的微生物进行控制或者消除,从而确保饮片的疗效和质量。另外,甘肃自古以来便是甘草、黄芪、党参的道地产区之一^[9-11],同时,甘肃省也是这 3 类药材的出产大省。因此,对甘肃道地产区的 3 种中药材品种微生物污染情况的研究对于甘肃省内以致国内市场都具有十分重要的意义。

基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(matrix assisted laser analytical ionization time of flight mass spectrometry, MALDI-TOF-MS)是近年来发展起来的一种新型软电离生物质谱。CHERKAOUI 等^[12]通过实验证实 MALDI-TOF-MS 是一种适用于细菌菌种鉴定的方法。另一方面, MALDI-TOF-MS 由于它的准确性和时效性,同时也被作为酵母菌鉴定的一种主要方法^[13-14]。在细菌菌种鉴定方面,尤其是当需要对大批量的样本进行鉴定时, MALDI-TOF-MS 有着不可替代的优势。中药材微生物污染较为严重,因此如需对菌落进行鉴定分型时,由于涉及菌

落繁多,按照传统生化鉴定方法耗时、耗力,短期难以完成。鉴于此,将传统生化方法与 MALDI-TOF-MS 仪器分析相结合,可以在较短时间内完成数据准确、有效的积累。本研究通过原产地进行中药材的收购,保证了样品的可溯源性和代表性;同时,参照 2015 年版《中国药典》四部并结合传统生化鉴定和 MALDI-TOF-MS 仪器鉴定的方法,积累了大量污染菌的相关原始数据,为后期污染菌的来源研究提供了大量的基础支撑和理论依据。另一方面,通过对污染菌的相关分析,企业为确保中药材的安全和质量,在饮片加工环节,可以采用有针对性的措施从而规避类似污染的发生。

1 材料与方法

1.1 实验样品

为确保样品的可溯源性,所有药材均从产地药材种植者中收购,并经过兰州市食品药品检验所中药室朱仁愿高级工程师进行鉴别。编号见表 1。

表 1 药材来源及编号信息

Table 1 Source and serial information of medicinal materials		
样品品名	样品产地	样品编号
甘草(<i>Glycyrrhizae radix et rhizoma</i>)	榆中哈岷乡	GC-1
	张掖市高台县	GC-2
	民勤县大坝乡	GC-3
黄芪(<i>Astragali radix</i>)	宕昌县哈达铺镇	HQ-1
	岷县梅川镇	HQ-2
	漳县三岔镇	HQ-3
党参(<i>Codonopsis radix</i>)	宕昌县哈达铺镇	DS-1
	岷县梅川镇	DS-2
	漳县三岔镇	DS-3

1.2 仪器与试剂

AC2-6S1 ESCO 生物安全柜(新加坡艺思高科技有限公司); GR-85 致微高压灭菌器(厦门致微仪器有限公司); IN750 Plus 恒温培养箱(德国美墨尔特仪器公司); MALDI-Biotyper 基质辅助激光解析飞行时间质谱仪(美国布鲁克公司)。

胰酪大豆胨液体培养基、RV 沙门菌增菌液体培养基、

木糖赖氨酸脱氧胆酸盐琼脂培养基、pH 7.0 氯化钠-蛋白胨缓冲液、胰酪大豆胨琼脂培养基、沙氏葡萄糖琼脂培养基(北京陆桥股份有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 供试品溶液的制备

将药材样品以无菌操作打粉,取打粉后的药材 25 g,用 pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液按照 1:10(W:W)进行稀释,充分混匀后吸取上清液,作为供试液。

1.3.2 需氧菌总数、霉菌和酵母菌总数的检查

取“1.3.1”项下的供试液,用 pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液分别稀释至 1:100、1:1000、1:10000、1:100000(V:V)。按照 2015 年版《中国药典》^[1]四部通则 1105 进行需氧菌总数(total aerobic microbial count, TAMC)、霉菌和酵母菌总数(total yeasts and molds count, TYMC)的测定。

1.3.3 耐热菌数(total thermophilic bacteria count, TB)的检查

将药材样品以无菌操作打粉,取打粉后的药材 25 g,用 pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液按照 1:10(W:W)进行稀释,于沸水浴(100 °C)热处理 30 min,充分混匀后吸取上清液,作为供试液。按照 1.3.2 项下需氧菌总数(TAMC)的方法进行耐热菌数的测定。

1.3.4 控制菌的检查

取 1.3.1 项下的供试液,分别按照 2015 年版《中国药典》^[1]四部通则 1106 项下的耐胆盐革兰阴性菌、大肠埃希菌、沙门菌、铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌项下实验方法进行检查。

1.3.5 鉴定

对 1.3.2~1.3.4 项下所有平板上培养出来的菌落根据大小和形态分别进行挑取和纯化培养(纯化培养使用胰酪大豆胨琼脂培养基),并参照仪器方法,挑取单个纯化菌落,使用 MALDI-TOF-MS 进行初步鉴定。如果鉴定结果不理想,多次进行纯化或者用血平板进行纯化后再进行鉴定。鉴定结果与仪器自带数据库进行比对并打分:打分值在 2.300~3.000 为“完全可靠鉴定到种的水平”;打分值在 2.000~2.299 为“可靠鉴定到属的水平,有可能鉴定到种的水平”;打分值在 1.700~1.999 为“有可能鉴定到属的水平”。为保证鉴定结果的准确性,后文所列鉴定结果相应打分值均在 2.000 以上。

2 结果与分析

由表 2 和表 3 可得,甘草、黄芪、党参 3 种中药材的需氧菌总数数值偏高,当经过 100 °C、30 min 的热处理,数值下降明显(图 1),甚至耐热菌总数数值出现“0”的情况,比如 GC-1、DS-1。霉菌和酵母菌总数个别数值较高,比如:GC-1,怀疑可能是由药材样品干燥不充分引起。

表 2 样品对应 TAMC、lgTAMC、TB、lgTB 的结果
Table 2 Results for samples corresponding to TAMC, lgTAMC, TB, lgTB

样品编号	TAMC/(CFU/g)	lgTAMC	TB/(CFU/g)	lgTB
GC-1	1.4×10 ⁶	6.14	0	/
GC-2	4.2×10 ⁶	6.62	95	1.98
GC-3	1.1×10 ⁷	7.04	30	1.48
HQ-1	4.2×10 ⁵	5.62	415	2.62
HQ-2	4.0×10 ⁵	5.60	395	2.60
HQ-3	9.8×10 ⁵	5.99	445	2.65
DS-1	2.3×10 ⁵	5.36	0	/
DS-2	8.1×10 ⁴	4.91	95	1.98
DS-3	5.4×10 ⁵	5.73	30	1.48

表 3 样品对应 TYMC、lgTYMC 的结果
Table 3 Results for samples corresponding to TYMC, lgTYMC

样品编号	TYMC/(CFU/g)	lgTYMC
GC-1	1.3×10 ⁴	4.11
GC-2	< 10	/
GC-3	55	1.74
HQ-1	10	1.00
HQ-2	< 10	/
HQ-3	10	1.00
DS-1	35	1.54
DS-2	1.2×10 ²	2.10
DS-3	40	1.60

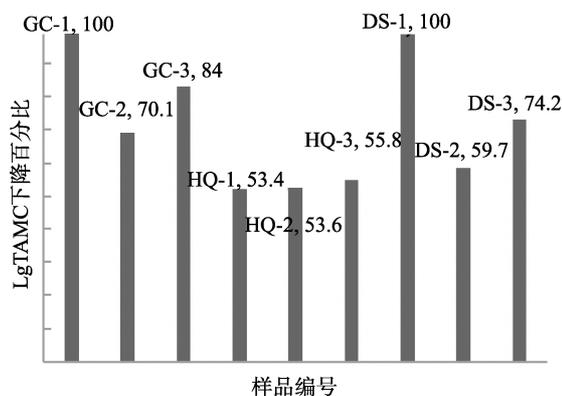


图 1 经过 100 °C、30 min 热处理后 lgTAMC 下降百分比
Fig.1 Percentage of lgTAMC decline after treated at 100 °C for 30 min

表 4 为从 1.3.2、1.3.4 项下平板上分离纯化并经过培

养后菌落的鉴定结果。由表 4 和图 2 可知, 成团泛菌和简单芽孢杆菌为鉴定频率较高的 2 种菌。成团泛菌(革兰氏阴性菌)在甘草、党参 3 批样品中均检出, 提示企业在后续的加工过程中, 可针对出现频次较高的菌采取有效的消除措施, 从而避免加工前药材本身带入的微生物污染的影响。

表 5 为从 1.3.3 项下平板上分离纯化培养后菌落的鉴定结果。由表 5 和图 3 可知, 药材样品经 100 °C、30 min 热处理后进一步进行菌种鉴定, 基本均为芽孢杆菌, 频次最高的为地衣芽孢杆菌和简单芽孢杆菌。需要注意的是未经热处理鉴定频次较高的菌也有简单芽孢杆菌。

表 4 MALDI-TOF-MS 鉴定结果
Table 4 Identification results of the MALDI-TOF-MS

样品编号	MALDI-TOF-MS 鉴定结果
GC-1	成团泛菌 <i>Pantoea agglomerans</i> 、产酸克雷伯菌 <i>Klebsiella oxytoca</i> 、绿色气球菌 <i>Aerococcus viridans</i> 、解林丹新鞘氨醇菌 <i>Siccibacter turicensis</i>
GC-2	成团泛菌 <i>Pantoea agglomerans</i> 、阴沟肠杆菌 <i>Enterobacter cloacea</i> 、铅黄肠球菌 <i>Enterobacter casseliflavus</i> 、生癌肠杆菌 <i>Enterobacter cancerogenus</i> 、高丽假单胞菌 <i>Pseudomonas koreensis</i>
GC-3	成团泛菌 <i>Pantoea agglomerans</i> 、桃色欧文氏菌 <i>Erwinia persicina</i> 、阿氏肠杆菌 <i>Enterobacter asburiae</i> 、屎肠球菌 <i>Enterobacter faecium</i> 、蒙太利假单胞菌 <i>Pseudomonas monteilii</i>
HQ-1	壁芽孢杆菌 <i>Bacillus muralis</i> 、蜡样芽孢杆菌 <i>Bacillus cereus</i> 、 <i>Bacillus</i> 、魏汉斯特范芽孢杆菌 <i>weihenstephanensis</i>
HQ-2	成团泛菌 <i>Pantoea agglomerans</i> 、球形赖氨酸杆菌 <i>Lysinibacillus sphaericus</i> 、路德维希(路氏)肠杆菌 <i>Enterobacter ludwigii</i>
HQ-3	壁芽孢杆菌 <i>Bacillus muralis</i> 、苏云金芽孢杆菌 <i>Bacillus thuringiensis</i> 、简单芽孢杆菌 <i>Bacillus simplex</i> 、病研所芽孢杆菌 <i>Bacillus idriensis</i> 、阴沟肠杆菌 <i>Enterobacter cloacea</i> 、克罗诺杆菌 <i>Cronobacter sp</i>
DS-1	莫哈维芽孢杆菌 <i>Bacillus mojavenis</i> 、魏汉斯特范芽孢杆菌 <i>Bacillus weihenstephanensis</i> 、简单芽孢杆菌 <i>Bacillus simplex</i> 、成团泛菌 <i>Pantoea agglomerans</i> 、高丽假单胞菌 <i>Pseudomonas koreensis</i>
DS-2	成团泛菌 <i>Pantoea agglomerans</i> 、温热泛菌 <i>Pantoea calida</i> 、枯草芽孢杆菌 <i>Bacillus subtilis</i>
DS-3	简单芽孢杆菌 <i>Bacillus simplex</i> 、地衣芽孢杆菌 <i>Bacillus licheniformis</i> 、成团泛菌 <i>Pantoea agglomerans</i> 、蜡样芽孢杆菌 <i>Bacillus cereus</i>

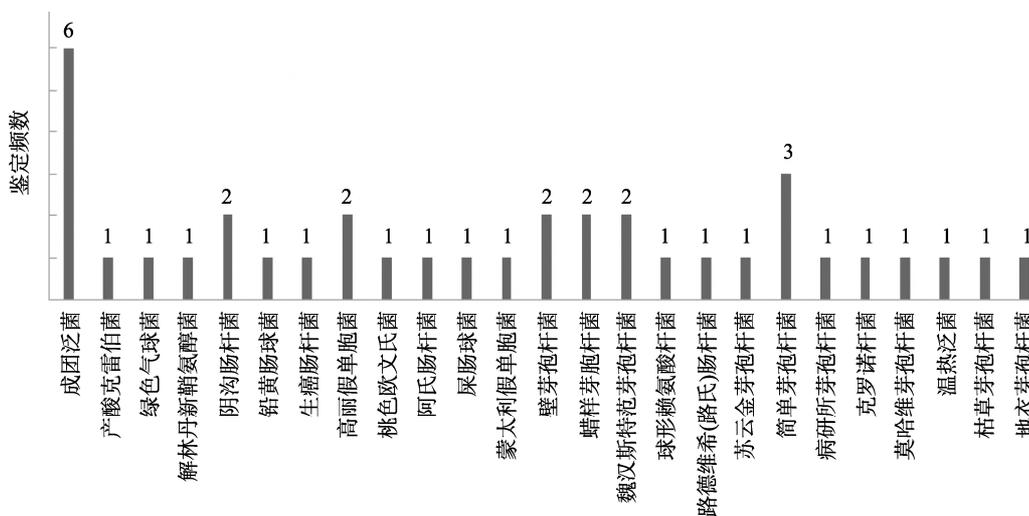


图 2 鉴定结果统计
Fig.2 Statistics of identification result

表 5 MALDI-TOF-MS 鉴定结果
Table 5 Identification results of the MALDI-TOF-MS

样品编号	MALDI-TOF-MS 鉴定结果
GC-1	/
GC-2	/
GC-3	/
HQ-1	简单芽孢杆菌 <i>Bacillus simplex</i>
HQ-2	蜡样芽孢杆菌 <i>Bacillus cereus</i>
HQ-3	/
DS-1	简单芽孢杆菌 <i>Bacillus simplex</i> 、地衣芽孢杆菌 <i>Bacillus licheniformis</i> 、
DS-2	地衣芽孢杆菌 <i>Bacillus licheniformis</i>
DS-1	地衣芽孢杆菌 <i>Bacillus licheniformis</i>

注：“/”表示未检出芽孢杆菌。

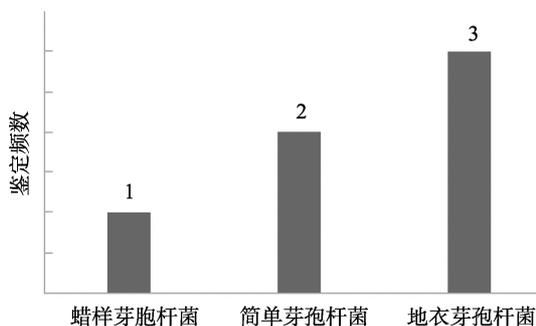


图 3 耐热菌鉴定结果统计

Fig.3 Statistical results of identification of *Thermophilic bacteria*

3 结论与讨论

9 批不同产地的甘草、黄芪和党参药材的 TAMC 数据均较高,但是在 100 °C、30 min 热处理后 TAMC 数据有明显下降,下降百分比均在 50%以上;9 批不同产地的甘草、黄芪和党参药材的 TYMC 数值差异较大,有的霉菌及酵母菌总数较高,如标号为 GC-1 的甘草药材,部分数值<10 CFU/g,如编号为 GC-2 和 HQ-2 的甘草和党参药材。提示相同品种的药材可能由于产地不同,微生物污染情况不同。

另外,当对 9 批药材需氧菌总数平板(胰酪大豆琼脂培养基)和控制菌检查平板中分离并纯化后的菌落进行鉴定后发现,不同产地,菌种鉴定结果差异较大。但是根据鉴定结果成团泛菌和简单芽孢杆菌污染概率较高;耐热菌分离鉴定结果显示地衣芽孢杆菌和简单芽孢杆菌污染概率均较高。成团泛菌属肠杆菌科,属于条件致病菌^[15]。总体来说,芽孢杆菌污染的概率较高,芽孢杆菌耐高温,而且无论在有氧和无氧条件下均可成活,因此,即便是在营

养匮乏的情况下都可以成活。

MALDI-TOF-MS 在大批量样本的鉴别时具有不可替代的优势,耗时短,出结果快。但是,由于其相匹配的数据库资源限制以及部分菌落生长状况和操作等多种因素的影响,会出现部分菌种无法鉴别的情况。因此,需要在 MALDI-TOF-MS 的基础上结合传统生化鉴定方法及 DNA 的相关方法进行进一步的确定。

总之,可能由于土壤污染和后期施肥管理以及运输等因素的影响,甘草、黄芪和党参药材存在一定程度的微生物污染。因此,在后期饮片加工过程或者使用中,应该采取适当、必要的措施以减少微生物污染,从而确保药材和饮片的疗效和质量。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 四部, 2015 年版[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015.
State Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the people's Republic of China: Volume IV [M]. Beijing: China Medical Science and Technology Press, 2015.
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 四部, 2020 年版[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020.
State Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the people's Republic of China: Volume IV [M]. Beijing: China Medical Science and Technology Press, 2020.
- [3] European Pharmacopoeia Commission. European pharmacopoeia 8.0 [S]. 2014.
- [4] US Pharmacopoeia Corporate Author. The United States pharmacopoeia 38th edition [M]. Rockville MD: The United States Pharmacopoeial Convention, 2015.
- [5] 日本药局方编辑委员会. 日本药典: 16 版[M]. 厚生省: 日本厚生省出版社, 2011.
Editorial Board of Japan Pharmaceutical Administration. Japanese Pharmacopoeia: 16.0 [M]. Ministry of Health and Welfare: Japan Ministry of Health and Welfare Press, 2011.
- [6] 邓彦, 王娅珂, 韩晓宇, 等. 不同品种根类中药饮片耐胆盐革兰阴性菌污染研究[J]. 中国中药杂志, 2017, 42(21): 4135-4141.
DENG Y, WANG YK, HAN XY, et al. Study on bile salt resistant gram negative bacteria contamination of different kinds of root Chinese herbal pieces [J]. Chin J Tradit Chin Med, 2017, 42(21): 4135-4141.
- [7] 江珍玉, 陈纯纯, 龚勇祥, 等. 5 种常见根类中药饮片微生物污染相关因素分析研究[J]. 中药材, 2018, 41(7): 1593-1597.
JIANG ZY, CHEN CC, GONG YX, et al. Analysis of related factors of microbial contamination in five common root Chinese herbal pieces [J]. Chin Herb Med, 2018, 41(7): 1593-1597.
- [8] 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.
ZHANG GH, WANG SJ, JIANG ZJ, et al. Investigation of microbial contamination for 10 kinds of tcm decoction pieces in Beijing area [J]. China Pharm, 2018, 29(14): 1940-1944.
- [9] 李成义, 马艳茹, 魏学明, 等. 甘肃道地药材甘草的资源状况分析[J]. 西部中医药, 2011, 24(7): 8-10.

- LI CY, MA YR, WEI XM, *et al.* Analysis on the resource status of *Glycyrrhizae* in Gansu province [J]. *Western J Tradit Chin Med*, 2011, 24(7): 8–10.
- [10] 李成义, 魏学明, 王明伟, 等. 甘肃道地药材党参的本草学研究[J]. *西部中医药*, 2012, 25(2): 12–14.
- LI CY, WEI XM, WANG MW, *et al.* Herbological study on *Codonopsis codonopsis* from Gansu province [J]. *Western J Tradit Chin Med*, 2012, 25(2): 12–14.
- [11] 何霖, 李福兵, 杨晓东. 地理、人文与甘肃道地药材[J]. *中药与临床*, 2010, 1(3): 46–50.
- HE L, LI FB, YANG XD. Geography, humanities and genuine medicinal materials of Gansu [J]. *Pharm Clinic Chin Med*, 2010, 1(3): 46–50.
- [12] CHERKAOUI A, HIBBS J, EMONET S, *et al.* Comparison of two matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry methods with conventional phenotypic identification for routine identification of bacteria to the species level [J]. *J Clin Microbiol*, 2010, (48): 1169–1175.
- [13] MARKLEIN G, JOSTEN M, KLANKE U, *et al.* Matrix assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for fast and reliable identification of clinical yeast isolates [J]. *J Clin Microbiol*, 2009, (47): 2912–2917.
- [14] PAN YL, CHOW NH, CHANG TC, *et al.* Identification of lethal *Aspergillus* at early growth stages based on matrix-assisted laser desorption/ionization time of-flight mass spectrometry [J]. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2011, (70): 344–354.
- [15] 杨君洋, 卢洪洲. 成团泛菌感染及其诊治的研究近况[J]. *上海医药*, 2016, 37(3): 48–50.
- YANG JY, LU HZ. Research progress on the infection and diagnosis and treatment of *Pantoea agglomerans* [J]. *Shanghai Med Pharm*, 2016, 37(3): 48–50.

(责任编辑: 张晓寒)

作者简介



白雯静, 硕士, 主管药师, 主要研究方向为食品、药品微生物检验。
E-mail: yd08joy@163.com