

# 中成药微生物污染状况检测分析

江伟伶, 姜丽君, 何绍萍, 廖祎璇, 梁慧君, 陈华龙\*

(韶关市食品药品检验所, 韶关 512000)

**摘要: 目的** 通过对516批中成药微生物污染情况及微生物种类进行检测分析, 为中成药的微生物控制提供参考。**方法** 参照《中华人民共和国药典(2020年版四部)》通则1105和1106进行微生物限度检查; 用VITEK2 Compact全自动微生物鉴定系统进行菌落鉴定。**结果** 所有样品的微生物限度检验均符合规定; 菌株鉴定结果为芽孢杆菌属、泛菌属、肺炎克雷伯菌和产酸克雷伯菌, 其中85%为芽孢杆菌属。**结论** 本文研究了中成药中常见的微生物污染类型, 为进一步优化中成药的微生物控制策略提供了重要参考, 对保障中成药的质量安全、提升生产工艺水平具有重要意义。

**关键词:** 中成药; 微生物污染; 微生物种类鉴定

## 0 引言

中成药在我国历史悠久, 使用广泛, 其作用、疗效、安全性等备受社会关注。中成药以中药材为原料, 大部分中成药的制法是以药材原粉入药, 而药材具有非常高的微生物载量<sup>[1-3]</sup>。此外药包材也可能带来微生物污染<sup>[4-5]</sup>, 药品生产、运输和储存等环节均可能受到微生物污染<sup>[6]</sup>, 因此中成药的微生物污染风险相对较高。药品微生物污染的危害主要有以下几个方面: (1)参与产品的降解, 使药品的有效成分降低甚至丧失; (2)产生真菌毒素、细菌内毒素、外毒素等毒性代谢产物, 可能会使人中毒, 致癌或产生其它不良反应; (3)导致患者发生继发性感染, 不利患者健康甚至危及生命。在国内外由微生物污染引起的药品召回事件中, 2008年的“刺五加事件”使人们充分认识到药品微生物污染的危害性<sup>[7]</sup>。因此有必要对中成药微生物污染状况进行分析, 了解污染种类, 根据污染类型制定科学合理的微生物控制方案, 以提高药品质量, 确保用药安全。本文对516批在韶关地区销售的中成药进行微生物限度的检测, 并对样品中出现的微生物进行分离鉴定, 了解微生物污染的分布情况及微生物污染种类, 为药品微生物污染控制提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品、培养基和试剂

样品购于广东省韶关市各零售药店, 共516批次, 剂型为

固体制剂其中包括颗粒、片剂、胶囊和丸剂。

胰酪大豆胨液体培养基(批号: 211209)、胰酪大豆胨琼脂培养基(批号: 210421)、沙氏葡萄糖琼脂培养基(批号: 211008)、麦康凯液体培养基(批号: 210823)、麦康凯琼脂培养基(批号: 220630)、肠道增菌液体培养基(批号: 2210102)、紫红胆盐琼脂培养基(批号: 220707)、RV沙门液体增菌培养基(批号: 210129)、木糖赖氨酸琼脂培养基(批号: 210129), 上述培养基均购于北京三药科技有限公司; 革兰氏染色液(批号: 6107152), 购于广东环凯微生物科技有限公司。

### 1.2 仪器

生化培养箱(LRH-250-A, 广东泰宏君科学仪器股份有限公司)、霉菌培养箱(MJ-250, 上海一恒科学仪器有限公司)、电子天平(JJ600Y, 常熟市双杰测试仪器厂)、匀浆仪(HTY-761, 杭州泰林生物技术设备有限公司)、生物安全柜(A2, 赛默飞)、显微镜(Axio lab.A1, 蔡司)、全自动微生物鉴定系统(VITEK2 COMPACT30, 梅里埃)。

### 1.3 菌株

大肠埃希氏菌[CMCC(B)44 102]、铜绿假单胞菌[CMCC(B)10 104]、沙门菌[CMCC(B)50 094], 均购于中国食品药品检定研究院。

### 1.4 试验方法

#### 1.4.1 微生物计数

供试液的制备: 取供试品10g, 加pH=7.0的氯化钠-蛋

基金项目: 韶关市科技计划项目(220602104530574)

第一作者: 江伟伶, 硕士, 研究方向为微生物检验。

\* 通信作者: 陈华龙, 副主任药师, 研究方向为药品检验。E-mail: 765482622@qq.com

白蛋白缓冲液至 100 mL, 用匀浆仪混匀, 作为 1:10 供试液。再用 pH=7.0 的氯化钠-蛋白胨缓冲液稀释至所需的稀释级。

需氧菌总数: 取 1:10、1:100 供试液各 2 mL, 分别注入 2 个平皿中(1 mL/皿)倾注胰酪大豆胨琼脂培养基混匀, 置 30~35°C 培养箱中培养 5 天。

霉菌和酵母菌总数: 分别吸取 1:10、1:100 供试液各 2 mL, 分别注入 2 个平皿中(1 mL/皿), 倾注沙氏葡萄糖琼脂培养基混匀, 置 20~25°C 培养箱中培养 7 天。

#### 1.4.2 控制菌检查

大肠埃希菌、耐胆盐革兰阴性菌和沙门菌的检验方法参照《中华人民共和国药典(2020年版四部)》通则 1106<sup>[8]</sup>。

#### 1.4.3 菌落鉴定

对需氧菌检查及控制菌检查中出现的菌落进行分离纯化, 用 VITEK2 Compact 全自动微生物鉴定系统进行菌落鉴定。

## 2 结果与分析

### 2.1 需氧菌总数检测结果

《中华人民共和国药典(2020年版)》中微生物限度标准: 不含药材原粉口服固体制剂需氧菌总数不得过  $10^3$  CFU/g, 含药材原粉的口服固体制剂不得过  $10^4$  CFU/g, 丸剂不得过  $3 \times 10^4$  CFU/g。516 批样品需氧菌检测结果见表 1, 其中检出需氧菌共 180 批, 检出率为 35%, 各剂型检出率分别为片剂 25%、胶囊 31%、颗粒 41%、丸剂 44%; 需氧菌总数的分布如下: 小于 10 CFU/g(即检测平板上没有菌落生长)的共 336 批, 占样品总数的 65.1%; 10~100 CFU/g 的共 158 批, 占样品总数的 30.6%; 100~1000 CFU/g 的共 20 批, 占样品总数的 3.9%; 1000~10000 CFU/g 的 2 批, 占样品总数的 0.4%; 所检测的 516 批药品需氧菌总数均符合《中华人民共和国药典》规定。

表 1 需氧菌总数分布

剂型	总批次	需氧菌总数分布(批)				合计	检出率
		$N < 10$ CFU/g	$0 \text{ CFU/g} < N < 100$ CFU/g	$100 \text{ CFU/g} \leq N < 1000$ CFU/g	$1000 \text{ CFU/g} \leq N < 10000$ CFU/g		
颗粒	149	88	58	3	0	61	41%
片剂	162	142	32	7	1	40	25%
胶囊	87	60	22	4	1	27	31%
丸剂	118	66	46	6	0	52	44%
合计	516	336	158	20	2	180	35%
占比	/	65.1%	30.6%	3.9%	0.4%	/	/

### 2.2 霉菌和酵母菌总数检测结果

《中华人民共和国药典》规定微生物限度标准: 口服固体制剂霉菌和酵母菌总数不得过  $10^2$  CFU/g, 霉菌和酵母菌总数的检测结果均符合药典规定, 检测结果小于 10 CFU/g 的有 483 批, 占比 94%; 有 33 批的结果分布在 10~100 CFU/g, 检出率为 6%。

### 2.3 控制菌检查结果

《中华人民共和国药典》规定微生物限度标准: 口服固体制剂不得检出大肠埃希菌(1 g), 含药材原粉的口服固体制剂不得检出沙门菌(10 g), 耐胆盐革兰氏阴性菌应小于  $10^2$  CFU/g。本次检测的所有样品中, 大肠埃希菌和沙门菌均未检出, 耐胆盐革兰氏阴性菌均小于 10 CFU/g, 控制菌的检查均符合药典规定。

### 2.4 污染菌株鉴定结果

从需氧菌检查平板中分离出 35 个菌株进行鉴定, 用 VITEK2 Compact 全自动微生物鉴定系统进行鉴定, 结果如下: 巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)、短小芽孢杆菌(*Bacillus pumilus*)、死谷芽孢杆菌(*Bacillus vallismortis*)、地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)、缓慢芽孢杆菌(*Bacillus lentus*)、侧孢短小芽孢杆菌(*Brevibacillus laterosporus*)和芽孢杆菌属(*Bacillus* spp.); 在控制菌检查过程中, 从麦康凯琼脂平板和木糖赖氨酸

琼脂平板分离出 6 个菌株, 鉴定结果为泛菌属(*Pantoea* spp.)、产酸克雷伯菌(*Klebsiella oxytoca*)和肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae* spp. pneumoniae); 所鉴定的污染菌株中 85% 为芽孢杆菌属。

## 3 讨论与结论

### 3.1 微生物污染情况

本次 516 个样品微生物限度检测的合格率为 100%, 大部分样品微生物负载都比较低, 65% 样品的需氧菌总数和 94% 样品的霉菌和酵母菌总数小于 10 CFU/g, 控制菌均未检出。不同剂型的样品中丸剂和颗粒的需氧菌检出率较高分别是 44%, 41%, 胶囊 31%, 片剂最低为 25%。其它三种剂型中检出需氧菌的共 119 批, 其中 101 批含药材原粉, 药材中微生物载量会比较高, 对于含药材原粉的药品还应对药材进行彻底灭菌。检出需氧菌的样品共 180 批, 检出率为 35%, 其中 178 批需氧菌总数检测结果分布在 10~1000 CFU/g, 有 2 批样品的微生物负载较高, 分布在 1000~10000 CFU/g, 存在超限值的风险; 霉菌和酵母菌检出共 33 批, 检出率为 6%, 分布在 10~100 CFU/g, 污染程度较轻; 菌落鉴定结果显示芽孢杆菌为主要的污染菌株, 同时检出一些条件致病菌泛菌属和肺炎克雷伯菌, 仍存在一定风险。

### 3.2 微生物污染风险分析

本次实验需氧菌检测发现 2 批次样品微生物负载较高, 储存不当或存在超限值的风险; 霉菌和酵母菌的污染虽然较轻, 但是临床上真菌感染治疗难度大, 药物选择有限; 鉴定的污染菌株主要为芽孢杆菌属, 部分条件致病菌泛菌属和肺炎克雷伯菌, 这些都存在潜在的风险。芽孢杆菌广泛存在于自然界, 其抗逆性和耐热性强, 不易被消杀, 一些耐热微生物研究中发现大部分耐热菌为芽孢杆菌属<sup>[9]</sup>, 其中包括本次实验鉴定的地衣芽孢杆菌和短小芽孢杆菌<sup>[10]</sup>, 2022 年至 2024 年间美国食品药品监督管理局 (FDA) 曾因芽孢杆菌属和地衣芽孢杆菌污染召回药品共 7 次<sup>[11]</sup>; 巨大芽孢杆菌、死谷芽孢杆菌、缓慢芽孢杆菌和侧短小芽孢杆菌, 广泛存在于土壤和水体中的细菌, 通常被认为是非致病性细菌, 极少数情况下可能对免疫缺陷患者构成风险 (如 HIV、化疗患者、器官移植受者); 泛菌属于条件致病菌, 在一定条件下可引起多种组织器官不同程度的感染<sup>[12]</sup>; 肺炎克雷伯菌广泛分布于自然界如土壤、水及动植物中, 是典型的条件致病菌, 常于宿主抵抗力低下时引起感染, 其中的肺炎克雷伯菌肺炎亚种感染可引起肺炎、支气管炎等<sup>[13]</sup>。这些菌具有一定的致病性, 存在足够数量时, 可通过给药途径导致患者发生感染, 即《中华人民共和国药典》中所描述的具有潜在危害的微生物, 国际上将这类微生物定义为不可接受微生物<sup>[14]</sup>。

### 3.3 微生物污染控制

药品生产过程控制: 药品中微生物的污染主要来源于原材料, 药包材、环境、人员、生产设备、工艺等, 因此微生物质量控制应该贯穿于产品的整个生命周期, 必须严格按照 GMP 的规定进行厂房建设、生产工艺制定、人员管理、生产管理, 制定科学有效的原辅料、环境消杀方案<sup>[15]</sup>。本实验中需氧菌鉴定结果大部分为芽孢杆菌属, 还有一部分因技术原因未能鉴定到明确的种属, 但是镜检为革兰氏阳性杆菌、产芽孢, 说明芽孢杆菌为药品中主要的污染菌株, 因此在消杀过程中应使用可以杀孢子的消毒剂或消毒方式。

提高微生物污染溯源能力: 首先要提高实验室的检测水平。实验室检测水平对于微生物污染鉴定和溯源非常重要, 必须加强微生物方面的专业技术人才队伍建设, 配备先进的仪器设备, 建立多元化的微生物鉴定方法。其次要对各生产环节中出现的微生物进行鉴定和溯源分析, 明确污染类型, 构建人员、环境、原辅料和产品污染菌库<sup>[16-17]</sup>, 加强对药品中微生物污染风险识别, 风险评估与控制, 特别对控制菌检验中出现的非目标菌应该进行进一步的鉴定和充分的风险评估。

### 参考文献

- [1] 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(06): 1068-1072.
- [2] 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.
- [3] 张光华, 王似锦, 张志杰, 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.
- [4] 战宏利, 马仕洪, 戴翠, 等. 口服液体药用塑料瓶微生物污染状况分析及试验方法改进 [J]. 药物分析杂志, 2014, 34(06): 1100-1105.
- [5] 刘鹏, 杨美琴, 戴翠, 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.
- [6] 胡立荣, 欧阳波, 文晓柯. 中药制剂生产中的微生物污染途径及控制 [J]. 中国药事, 2015, 29(6): 613-617.
- [7] 张东风. 刺五加事件为污染所致并非药品不良反应 [N]. 中国中医药报, 2008-11-12(010).
- [8] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 2020 版四部 [S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020.
- [9] 张学博, 郁爱萍, 陆春胜. 中药饮片耐热微生物研究 [J]. 亚太传统医药, 2021, 17(11): 56-60.
- [10] 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(05): 859-865.
- [11] Food and Drug Administration. Drug Recalls. [EB/OL]. [2024-05-06] <https://www.fda.gov/drugs/drug-safety-and-availability/drug-recalls> [2025-01-05].
- [12] CRUZ AT, CAZACU AC, ALLEN CH. Pantoea agglomerans, a plant pathogen causing human disease [J]. J Clin Microbiol, 2007, 45(06): 1989-1992.
- [13] 李凡, 徐志凯. 医学微生物学第 9 版 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2018: 114-115.
- [14] SUTLON S. What is an "objectionable organism"? [J]. Am Pharm Rev, 2012, 15(06): 1-13.
- [15] 颜若曦. 无菌药品污染控制策略要点探析 [J]. 医药导报, 2023, 42(09): 1424-1428.
- [16] 胡立荣, 欧阳波, 文晓柯. 中药制剂生产中的微生物污染途径及控制 [J]. 中国药事, 2015, 29(06): 613-617.
- [17] 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(05): 513-519.