

中药饮片微生物限度检查方法探究及质量控制

吴伟*

(金昌市药品检验检测中心, 金昌 737100)

摘要: 中药饮片作为中医临床常用剂型, 其微生物质量直接关系到用药安全。基于此, 本文综述了中药饮片微生物限度检查的主要项目。并详细介绍传统检查方法平板计数法, 以及新兴的 PCR 技术和高通量测序技术在中药饮片微生物检测中的应用。同时, 探讨了中药饮片微生物质量控制策略, 从样品采集与保存的质量控制、检验过程、结果判定等方面提出了具体措施。本文旨在为提高中药饮片微生物检测水平和质量控制提供参考。

关键词: 中药饮片; 微生物限度; 检查方法; 质量控制

0 引言

中药饮片作为中药的一种常用剂型, 在中医临床治疗中发挥着重要作用。然而, 由于中药材来源复杂, 加工过程繁琐, 易受到微生物污染, 进而影响药品质量和用药安全。为保证中药饮片质量, 开展微生物限度检查至关重要^[1]。传统的微生物检测方法平板计数法操作简单, 但耗时较长, 灵敏度和特异性不高。近年来, 多种新兴检测技术不断涌现, 如聚合酶链式反应技术(PCR)和高通量测序技术, 大大提高了微生物检测的效率和准确性。在中药饮片生产过程中, 从原料到成品的全链条质量控制, 对于降低微生物污染风险, 确保用药安全具有重要意义。本文将就中药饮片微生物限度检查方法及质量控制策略进行探讨, 为中药饮片质量提升提供参考。

1 中药饮片微生物限度检查项目

中药饮片作为中医临床的常用剂型, 其微生物质量直接关系到用药安全。为保证中药饮片质量, 防范潜在的健康风险, 必须严格按照药典标准开展微生物限度检查。根据《中华人民共和国药典》的规定, 中药饮片微生物限度检查主要包括总菌数、霉菌和酵母菌数、大肠菌群以及特定致病菌如沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌和志贺氏菌等^[2]。

总菌数检查是评估中药饮片整体微生物污染水平的重要指标。过高的总菌数则提示在药材种植、采收、加工、储运等环节卫生条件不佳, 或贮藏条件不当, 容易导致饮片变质, 甚至引起感染。霉菌和酵母菌数反映了真菌污染的严重程度。一些霉菌如曲霉可产生致癌的黄曲霉毒素等有毒次生代谢产物, 重度污染的中药材服用后会引发急性中毒或者慢性损害。

大肠菌群作为重要的卫生指示菌, 其检出往往提示在制备过程中存在卫生条件欠佳或受到粪便污染的问题^[3]。沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌和志贺氏菌等病原菌一旦超标, 可

能引起急性肠胃炎、伤寒、败血症等严重的感染性疾病, 威胁患者生命安全。因此, 加强这些致病菌的检测对于保障中药饮片的质量安全至关重要。此外, 对于外用或直接接触皮肤黏膜的特殊中药饮片, 如凡士林软膏、芒硝等, 除了常规项目外, 还需重点关注表皮葡萄球菌、白色念珠菌、溶血性链球菌等皮肤致病菌的检查, 以防止局部感染的发生^[4]。总之, 开展全面、规范的微生物限度检查, 建立科学、严格的质量标准, 是确保中药饮片质量安全, 保障患者用药安全的重要举措。

2 中药饮片微生物限度检查方法

2.1 传统检查方法

平板计数法是中药饮片微生物限度检查中最传统和常用的方法之一^[5]。该方法基于微生物在固体培养基上形成可见菌落的原理, 通过菌落计数估算样品中微生物的数量。具体操作流程包括样品前处理、样液制备、接种、培养和计数等步骤。

在开展平板计数法检测之前, 首先需要进行方法适用性试验, 以确保该方法适用于特定的中药饮片样品^[6]。方法适用性试验主要包括回收率试验和抑菌试验两部分。回收率试验是将已知数量的标准菌株接种到样品中, 经过处理后进行平板计数, 计算回收率。通常选择大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、枯草芽胞杆菌和白色念珠菌等作为指示菌。回收率应在 50%~200% 之间为合格^[7]。抑菌试验是将标准菌株接种到含有和不含有样品的培养基中, 比较菌落数量, 评估样品是否对微生物生长有抑制作用。如果样品具有抑菌作用, 需采取适当的中和措施。

样品前处理通常采用生理盐水或缓冲液稀释并充分振荡, 制备成一系列梯度稀释液。将适宜稀释度的样液接种于平板培养基表面, 采用涂布法或混合倾注法使微生物分散生长。

控制菌检查是平板计数法质量控制的重要环节。在每次检测中, 应同时进行阴性对照和阳性对照试验。阴性对照使用无

* 通信作者: 吴伟, 工程师, 研究方向为药品微生物检验。E-mail: 309082700@qq.com

菌的稀释液或培养基，用于检查实验过程是否引入污染。阳性对照使用已知浓度的标准菌株，用于验证培养基的生长支持能力和检测方法的有效性。常用的控制菌包括大肠埃希菌 CMCC (B)44102、金黄色葡萄球菌 CMCC(B)26003、沙门菌 CMCC(B)50094、铜绿假单胞菌 CMCC(B)10104 等^[8]。控制菌应能在规定的培养条件下产生典型菌落。

此外，平板计数法还应注意以下几点：1)样品制备过程中应注意无菌操作，避免引入外源污染；2)针对不同类型的中药饮片，可能需要优化前处理方法，如调整稀释倍数、中和剂种类等；3)对于含有抑菌成分的样品，可采用膜过滤法或最大可能稀释法；4)应定期评估检测人员的操作技能，确保计数结果的准确性和可重复性。

平板计数法操作简单，成本低廉，可广泛应用于中药饮片总菌数、霉菌和酵母菌数以及大肠菌群的定量检查。但该方法耗时较长，一般需要 2~7 天的培养时间，无法满足快速检测的需求^[9]。此外，平板计数法难以区分死活菌，部分受损或处于休眠状态的微生物可能无法在培养基上生长，导致检测结果偏低。对于需氧菌和兼性厌氧菌，平板计数法检出率较高，但对专性厌氧菌和极端环境微生物则不太适用^[10]。

2.2 新兴检测方法

2.2.1 聚合酶链式反应技术

聚合酶链式反应 (PCR) 技术是一种基于核酸扩增的分子生物学方法，在中药饮片微生物限度检查中具有广阔的应用前景。该方法利用特异性引物和热稳定性 DNA 聚合酶，通过高温变性、引物退火和延伸等温度循环，实现目标 DNA 片段的指数扩增，从而达到高灵敏、高特异检测微生物的目的。PCR 技术适用于中药饮片中致病菌如沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌等的定性或定量检测^[11]。检测流程包括样品制备、DNA 提取、PCR 扩增和结果分析等步骤。样品经前处理后，提取微生物总 DNA，以其为模板进行 PCR 扩增。扩增产物可通过凝胶电泳、荧光标记、探针杂交等方法进行定性或定量分析。

在中药饮片致病菌检测中，PCR 技术展现出良好的应用效果。例如，利用多重 PCR 技术对蜂王浆中沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌进行定性检测，结果表明灵敏度可达 10 CFU/g，特异性达 100%，与传统方法相比大大缩短了检测时间；采用荧光 PCR 技术对庆阳产 10 种中药饮片中铅青霉、黄曲霉和毛霉菌进行定量检测，检出限低至 10 CFU/g，与显微镜计数法结果具有良好的相关性，证实了该技术用于中药饮片真菌污染检测的可行性和优越性^[12]。

与传统培养法相比，PCR 技术具有检测速度快、灵敏度高、特异性强等优点。通过合理设计引物和探针，可实现对不同菌种的同时检测和鉴别^[13]。定量 PCR 技术如实时荧光定量 PCR，可精确定量样品中的目标微生物数量，为中药饮片的质量控制提供可靠依据。但 PCR 检测也存在一些局限性，如容易出现假阳性结果，难以区分死活菌，对检测环境和操作人员的要求较高等。此外，PCR 检测的前提是已知目标微生物的基因序列信息，对于未知或突变菌株的检出能力有限^[14]。

2.2.2 高通量测序技术

高通量测序技术是近年来发展迅速的一种革命性 DNA 测

序方法，在微生物组学研究中得到广泛应用^[15]。该技术通过对样品中微生物的 16S rRNA 或其他标记基因进行大规模平行测序，可一次性获得样品中所有微生物的群落结构和相对丰度信息，为中药饮片微生物污染的全面评估提供了新思路。高通量测序技术适用于中药饮片中细菌、真菌等微生物多样性的整体分析，可同时检测数百种微生物，远超传统方法的检出范围^[16]。检测流程包括样品制备、DNA 提取、文库构建、测序和生物信息学分析等步骤。样品经前处理后，提取微生物总 DNA，通过 PCR 扩增特定的标记基因，构建测序文库。利用高通量测序平台进行大规模测序，获得海量的序列数据。通过序列拼接、质控、比对和聚类等生物信息学分析，获得样品中微生物的物种分类和相对丰度信息。在中药饮片微生物多样性分析中，高通量测序技术取得了良好的应用效果。例如，有研究人员利用 16S rRNA 基因测序技术对 10 种常见中药饮片的细菌多样性进行了分析，共检出 37 门、347 属细菌，主要优势菌群为变形菌门、厚壁菌门和放线菌门^[17]。不同饮片的细菌群落结构存在显著差异，反映了药材来源、炮制工艺等因素的影响^[18]。

与传统方法相比，高通量测序技术具有检测通量高、分辨率高、覆盖面广等优点，可全面揭示中药饮片中的微生物组成，包括一些未知或难培养的微生物^[19]。同时，该技术可同时获得样品间的差异信息，有助于溯源分析和污染控制。但高通量测序技术也存在一些局限性，如样品处理过程易引入污染，PCR 扩增易产生偏倚，短读长序列拼接和物种注释存在误差等^[20]。

3 中药饮片微生物检测质量控制策略

3.1 样品采集与保存的质量控制

中药饮片微生物检测的起点是样品的采集，采样过程中的任何偏差都将影响后续检测结果的准确性和可靠性。样品应具有代表性，采样部位、数量、方法需严格遵循标准操作规程。采样器具应洁净、灭菌，与样品接触的容器和转移工具应避免引入外源性污染。采样环境应清洁卫生，避免灰尘和异物沾染样品。采样人员应经过专业培训，规范个人卫生和防护，防止交叉污染的发生。

样品采集后应及时进行处理和保存，不同类型和性状的中药饮片可能需要不同的保存条件。一般应置于清洁、干燥、通风良好的环境中，避免阳光直射和高温，防止霉变和虫蛀。若样品需要长途运输，应选择隔热、防震、防潮的包装材料，采用冷链运输或低温保存，并在规定时限内尽快送达实验室。

样品保存过程中应定期检查其完整性和状态，发现破损、泄漏、污染等问题及时处理。样品应按照类别、批号分别存放，并正确标识，避免混淆。对于需要长期保存的样品，应采取适当的措施防止微生物繁殖，如低温冷冻、干燥或添加防腐剂等。样品使用后的剩余部分若需再次检测，应在规定条件下妥善保存。

总之，样品采集与保存是中药饮片微生物检测质量控制的第一关，应根据样品特性制定科学、规范的采样方案和保存条件，最大限度减少样品污染和变质，为后续检测奠定基础。同时，应加强对采样和保存过程的监督和管理，建立可追溯的样品信息记录系统，确保样品质量可控。

3.2 检验过程的质量控制

中药饮片微生物检测的核心环节是检验过程,其质量控制的有效实施直接关系到检测结果的准确性和可靠性。首先,检验方法的选择应依据标准、法规或验证方法学,并经过实验室确认其适用性。操作步骤应规范、明确,严格遵守无菌技术要求,做好检测环境和设备的清洁、灭菌与维护。其次,检测试剂和培养基质量至关重要,应选用可溯源的标准物质,按照说明书要求进行性能验证,确保其灵敏度、选择性和稳定性。再次,检测过程应设置适当的质控措施,如空白对照、阳性和阴性对照,以监测检测系统的无菌性、可靠性;设置平行样,以评估检测结果的精密度;对于定量检测,应绘制标准曲线,校准仪器设备,控制检测过程的系统误差。此外,实验室应建立完善的质量管理体系,包括人员培训与考核、设备校准与维护、试剂耗材管理、检测环境监控、内部质控与比对、结果审核与报告等,并形成标准操作规程和质量记录。最后,应定期开展能力验证和实验室间比对,以外部质评的方式评估检测性能,确保结果的准确性和可比性。总之,检验过程质量控制应从方法、材料、设备、环境、人员等方面着手,严格遵循相关标准和规范,持续改进质量管理体系,确保检测全过程处于受控状态,为中药饮片的质量与安全提供可靠保证。

3.3 结果判定的质量控制

中药饮片微生物限度检查结果的判定是检验过程中至关重要的环节,其质量控制对于确保检测结果的准确性、可靠性和一致性具有重要意义。结果判定的质量控制应严格遵循相关标准和规范,如《中华人民共和国药典》等。判定前应对原始检测记录和数据进行全面审核,核对样品信息、检测方法、质控数据等是否完整、准确,确保可追溯。对于定性检测,应观察是否检出目标微生物,结合阳性和阴性对照的结果进行综合分析;对于定量检测,应准确计数菌落数,并依据标准规定的限度值进行判断。当检出菌落数超过限度值时,应进行确证试验,必要时采用其他方法进行复核。结果判定应由专业技术人员独立完成,疑难样品可由多人会审讨论后做出判断。判定人员应经过专业培训和能力考核,熟悉相关标准方法和判定规则。实验室应建立结果审核制度,对每批样品的检测结果进行复核,确保判定的准确性。对于不合格样品,应进行原因分析,并采取纠偏措施,同时评估对已出具结果的影响。此外,应定期开展人员能力比对和实验室间结果比对,以评估人员的判读水平和实验室结果的一致性。数据处理和统计分析是结果质控的另一个重要方面,应选择合适的统计学方法,对数据进行规范化处理,评估检测结果的精密度、准确度、重复性等指标,确保数据分析的科学性和可靠性。

4 结束语

中药饮片的微生物限度检查是保证其质量安全的重要手段。传统检查方法如平板计数法和显微镜观察法操作简便,但存在耗时长、灵敏度低等不足。新兴的PCR技术和高通量测序技术极大提高了检测效率和准确性,为中药饮片微生物检测提供了新思路。未来,应进一步完善检测方法,建立标准化的操

作规程。同时,加强从样品采集与保存到结果判定的全链条质量控制,采取有效措施降低微生物污染风险。随着检测技术的不断进步和质量控制体系的不断完善,中药饮片的微生物质量有望得到进一步提升,为临床用药安全提供有力保障。

参考文献

- [1] 徐佳宁,朱学飞,姚敏,等.中药饮片蜂王浆微生物限度检查方法研究[J].蜜蜂杂志,2024,44(04):11-16.
- [2] 徐昕怡,贺浪冲,张启明,等.《中华人民共和国药典》2025年版理化分析通用技术要求编制大纲简介[J].中国药品标准,2023,24(04):331-336.
- [3] 张煜琳,李哲,周芸,等.10种庆阳产中药饮片微生物污染状况调研[J].化工管理,2023,(11):40-44.
- [4] 朱加武,李辉.中药饮片生物负载定量化风险评估方法研究[J].中国药业,2022,31(15):65-70.
- [5] 沈泓,孙晗,何凯伦,等.10种常见中药饮片微生物污染相关因素研究[J].中国现代应用药学,2022,39(10):1317-1321.
- [6] 刘康连,庞云娟,梁晓玲,等.中药饮片三七粉微生物限度检查方法适用性试验[J].中国医药导报,2023,20(15):118-122.
- [7] 杨昊,周爽,杨戈,等.市售11种煎煮类中药饮片微生物污染情况考察[J].药学研究,2023,42(05):321-325.
- [8] 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.
- [9] 侯晓玲,李瑶,郭华荣,等.中药饮片金银花微生物污染状况考察[J].中兽医医药杂志,2023,42(01):68-72.
- [10] 尹良军,杨晓莉,王文娟,等.中药饮片金银花、菊花微生物限度检查方法研究[J].药品评价,2022,19(10):585-588.
- [11] 朱文娟,黎丽敏,李锦妹,等.3种半夏饮片的微生物污染状况考察[J].中南药学,2022,20(05):1153-1157.
- [12] 申应德,张文萌,王伟,等.中药饮片金银花的微生物污染分析[J].中国药物评价,2022,39(01):36-40.
- [13] 田妮娜,白雯静,张彩霞,等.甘肃地区海螵蛸饮片的微生物污染状况考察[J].中国卫生检验杂志,2020,30(22):2777-2779.
- [14] 易伟,李思,吴晶晶,等.清肾丸的微生物限度检查及影响因素分析[J].中国医药导报,2020,17(30):138-141.
- [15] 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(05):922-927.
- [16] 甘永琦,王涛,苏顶,等.通草饮片的微生物污染状况考察[J].华西药学杂志,2018,33(01):52-56.
- [17] 吴鑫.10种中药饮片微生物限度检查方法的建立及污染的研究[D].杭州:浙江工业大学,2017.
- [18] 蒋惠源,钱桂英.中药饮片枸杞子微生物污染调查[J].江苏科技信息,2016,(34):70-72.
- [19] 邵力成,潘建文,谢文明,等.中药饮片菊花、浙贝母的微生物污染状况及其微生物限度标准的研究[J].中南药学,2015,13(10):1093-1095.
- [20] 王丽萍,杨金华,陈天朝.乙醇蒸气灭菌中药饮片的方法探讨[J].中国药房,2012,23(35):3308-3309.