

中成药中不可接受微生物检测方法的建立

李趣嫦*, 江艳芳, 陈明桥

广东省药品检验所, 广东 广州

收稿日期: 2026年8月4日; 录用日期: 2026年9月3日; 发布日期: 2026年9月9日

摘要

目的: 建立实验室内部对中成药中不可接受微生物监测的定性检查方法, 探讨中成药污染的条件致病菌的常见种类。方法: 使用胰酪大豆胨液体培养基(TSB)为样品的初增菌培养基, 置32.5℃培养24 h。取培养物划线接种于胰酪大豆胨琼脂培养基(TSA)平板中, 置32.5℃培养24 h。挑取在TSA中生长的微生物使用全自动快速微生物质谱鉴定系统鉴定。结果: 本方法的检测限为1 CFU·mL⁻¹ (g⁻¹), 专属性符合要求, 重复性和耐用性良好。样品的蜡样芽孢杆菌和屎肠球菌检出率为3.6%和1.5%, 其余条件致病菌未检出。结论: 本方法使用非选择性培养基提高中成药中条件致病菌的种类检出, 有利于促进实验室对中成药不可接受微生物更有效监测与管理。

关键词

中成药, 不可接受微生物, 监测, 方法建立

Establishment of Detection Method for Objectionable Microorganisms in Chinese Patent Medicines

Quchang Li*, Yanfang Jiang, Mingqiao Chen

Guangdong Institute for Drug Control, Guangzhou Guangdong

Received: August 4, 2026; accepted: September 3, 2026; published: September 9, 2026

Abstract

Objective: To establish a qualitative detection method for objectionable microorganisms in Chinese patent medicines within the laboratory and to identify common pathogenic bacteria responsible for contamination. **Methods:** Using pancreatic casein soy peptone liquid medium (TSB) as the initial

*通讯作者。

文章引用: 李趣嫦, 江艳芳, 陈明桥. 中成药中不可接受微生物检测方法的建立[J]. 药物资讯, 2026, 15(5): 488-494.

DOI: 10.12677/pi.2026.155052

culture medium for the sample, and incubated at 32.5°C for 24 h. The cultures are streaked onto pancreatic casein soy peptone agar (TSA) plates and incubated at 32.5°C for 24 h. Microorganisms grow on TSA are identified using an automated rapid microbial mass spectrometry identification system. Results: The detection limit of this method is 1 CFU·mL⁻¹ (g⁻¹). The specificity meets the requirements, with good repeatability and durability. The detection rates of *Bacillus cereus* and *Enterococcus faecium* in the samples were 3.6% and 1.5%, respectively; no other opportunistic pathogens were detected. Conclusion: This method employs a non-selective culture medium to enhance the identification of opportunistic pathogens in traditional Chinese patent medicines, thereby facilitating enhanced monitoring and management of objectionable microorganisms in pharmaceutical products by the laboratory.

Keywords

Chinese Patent Medicines, Objectionable Microorganisms, Monitor, Method Establishment

Copyright © 2026 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

不可接受微生物是指能够在非无菌产品中生存或繁殖,对产品理化特性产生不利影响、破坏其功能及疗效,或经特定给药途径对患者健康造成损害的潜在危害微生物[1]。一般来说,不可接受微生物是通过给药途径能够致病的微生物[2]。由于中成药所使用的中药材及中药饮片在种植、采收、储存等过程中易受来自土壤和水环境等的微生物污染[3]-[9];且部分中成药如丸剂、胶囊剂、散剂等的生产工艺中常有使用药材原粉入药,很容易导致原辅料中的微生物残留在药品中。故应加强中成药在药典中未列明的不可接受微生物的监测。本研究选择中药材及中药饮片、制药用水等常见有潜在危害的微生物为代表菌株,对中成药中不可接受微生物进行检测方法的建立,以监测日常检验的中成药中不可接受微生物的微生物种类及污染风险,加强对其条件致病菌的监测,提高药品质量,降低或消除用药中不可接受微生物对患者造成的安全隐患。

2. 仪器与材料

2.1. 仪器

MIR-254-PC 型生化培养箱(松下); Thermo Scientific 1300 Series A2 型生物安全柜(美国赛默飞世尔科技); JA21002 型精密电子天平(上海舜宇恒平科学仪器有限公司); Lab dancer 漩涡混合器(德国 IKA 艾卡集团); ED 型恒温水浴箱(德国优莱博公司); 全自动快速微生物质谱鉴定系统(布鲁克公司); 全自动微生物基因指纹鉴定系统(美国赛默飞世尔科技)。

2.2. 培养基

胰酪大豆胨琼脂培养基(批号 231019A20、240229)、胰酪大豆胨液体培养基(批号 240329A20、240805、250213A20)、沙氏葡萄糖液体培养基(批号 230413A20)。购自广东环凯微生物科技有限公司和北京三药生物技术有限公司。以上培养基的适用性检查均符合《中国药典》2020 年版规定。

2.3. 菌种

标准菌株: 大肠埃希菌(*Escherichia coli*) (CMCC(B)44 102)、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)

(CMCC(B)10 104)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) (CMCC(B)26 003)、乙型副伤寒沙门菌(*Salmonella paratyphi* B) (CMCC(B)50 094)、洋葱伯克霍尔德菌(*Burkholderia cepacia*) (CMCC(B)23 005)、新洋葱伯克霍尔德菌(*Burkholderia cenocepacia*) (CMCC(B)23 006)、神秘伯克霍尔德菌(*Burkholderia ae-nigmatica*) (CMCC(B)23 010)、白色念珠菌(*Candida albicans*) (CMCC(F)98 001), 购自中国食品药品检定研究院。肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*) (CMCC(B)46 117)、阪崎肠杆菌(*Enterobacter sakazakii*) (ATCC 51329) 购自广东省食品微生物安全工程技术研究开发中心食品安全菌种保藏中心。

野生菌株: 屎肠球菌、沙门菌、阴沟肠杆菌、鲍曼不动杆菌、肺炎克雷伯菌、克罗诺杆菌、大肠埃希菌、蜡样芽孢杆菌、恶臭假单胞菌、洋葱伯克霍尔德菌, 来源于中药饮片、中成药及制水系统。

2.4. 试药

样品为 2023 年至 2025 年日常中成药检品, 主要来源于注册和委托检验, 其中颗粒剂 79 批、胶囊剂 43 批、丸剂 48 批、片剂 59 批、溶液剂 24 批, 共 274 批次, 样品编号为 S1~S274。

3. 方法与结果

3.1. 检验方法

取 1:10 供试液 10 mL, 接种至胰酪大豆胨液体培养基(TSB)中, 置 32.5℃培养 24 h。取上述培养物一环划线接种于胰酪大豆胨琼脂培养基(TSA)平板上, 置 32.5℃培养 24 h。挑取在 TSA 平板上生长的单菌落, 均匀涂抹于检测靶板上, 自然干燥后加入 70%甲酸溶液 1 μ L, 干燥后加入 α -氰基-4-羟基肉桂酸(HCCA)基质溶液 1 μ L, 充分晾干后使用全自动快速微生物质谱鉴定系统进行鉴定。

3.2. 菌液制备

取 1.4 项下各菌株的新鲜培养物, 按《中国药典》的方法制成 $<100 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和约 $10 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的各菌悬液。

3.3. 各组别的制备

3.3.1. 供试液制备

固体制剂为取 10 g, 加入 TSB, 根据品种的特性使用匀浆仪打碎、水浴加热或振摇等方式使样品溶散[10], 制成 1:10 供试液; 液体制剂为取样品, 混匀, 制成供试液。

3.3.2. 试验组

取 2.2.1 项下制备好的供试液 1 mL 或 1:10 供试液 10 mL, 接种至 100 mL TSB 中, 混匀, 置 32.5℃培养 24 h。取上述培养物直接划线于 TSA 平板上, 置 32.5℃培养 24 h, 观察平板上是否有菌落生长, 如有菌落生长, 使用全自动快速微生物质谱鉴定系统对菌落进行鉴定。

3.3.3. 阴性对照

取 100 mL 的胰酪大豆胨液体培养基, 置 32.5℃培养 24 h。

3.3.4. 对照组

取上述大肠埃希菌、铜绿假单胞菌、乙型副伤寒沙门菌、金黄色葡萄球菌、蜡样芽孢杆菌、屎肠球菌和白色念珠菌 $<100 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的菌悬液, 接种至 100 mL TSB 中, 置 32.5℃培养 24 h。

3.4. 专属性试验

包容性试验: 选择 1.4 项下的株标准菌株和野生菌株 $<100 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的菌悬液, 接种至 100 mL 的

胰酪大豆胨液体培养基中，按 2.1 进行实验，均可检出目标菌株，结果见表 1。其中，质谱鉴定分值的含义为 2.00~3.00 为高置信度鉴定；1.70~1.99 低置信度鉴定；0.00~1.69 无生物体鉴定。

排他性试验：由于 TSB、TSA 均为非选择性培养基；且本研究的目的是监测不可接受微生物的数量，故不需要设置排他性试验。

Table 1. Specificity test results
表 1. 专属性试验结果

菌株编号	菌株名称	来源	胰酪大豆胨 液体培养基	质谱鉴定信息
CMCC (B) 44 102	大肠埃希菌	标准菌株	+	<i>Escherichia coli</i> (2.32)
CMCC (B) 26 003	金黄色葡萄球菌	标准菌株	+	<i>Staphylococcus aureus</i> (2.32)
CMCC (B) 10 104	铜绿假单胞菌	标准菌株	+	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (2.33)
CMCC (B) 50 094	乙型副伤寒沙门菌	标准菌株	+	<i>Salmonella</i> sp (2.28)
CMCC (B) 23 005	洋葱伯克霍尔德菌	标准菌株	+	<i>Burkholderia cepacia</i> (2.39)
CMCC (B) 23 006	新洋葱伯克霍尔德菌	标准菌株	+	<i>Burkholderia cenocepacia</i> (2.40)
CMCC (B) 23 010	神秘洋葱伯克霍尔德菌	标准菌株	+	<i>Burkholderia cepacia</i> (2.18)
CMCC (F) 98 001	白色念珠菌	标准菌株	+	<i>Candida albicans</i> (2.22)
CMCC (B) 46 117	肺炎克雷伯氏菌	标准菌株	+	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (2.34)
ATCC51329	阪崎肠杆菌	标准菌株	+	<i>Cronobacter</i> sp (2.22)
2024-36	屎肠球菌	中成药	+	<i>Enterococcus faecium</i> (2.33)
2023YL-8	沙门菌	中药饮片	+	<i>Salmonella</i> sp (2.18)
ZSY-1S	阴沟肠杆菌	中药饮片	+	<i>Enterobacter cloacae</i> (2.46)
BZY-1X	鲍曼不动杆菌	中药饮片	+	<i>Acinetobacter baumannii</i> (2.35)
HPY-1D-2	肺炎克雷伯菌	中药饮片	+	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (2.42)
JHP-1S	克罗诺杆菌	中药饮片	+	<i>Cronobacter</i> sp (2.47)
HPY-1D-1	大肠埃希菌	中药饮片	+	<i>Escherichia coli</i> (2.31)
2024-34	蜡样芽孢杆菌	中成药	+	<i>Bacillus cereus</i> (2.28)
GHXY-1Z	恶臭假单胞菌	中药饮片	+	<i>Pseudomonas putida</i> (2.02)
2025-103	洋葱伯克霍尔德菌	水系统	+	<i>Burkholderia cepacia</i> (2.13)

注：“+”为生长。

3.5. 检测限

取代表性菌株，属革兰氏阳性菌的金黄色葡萄球菌、蜡样芽孢杆菌、屎肠球菌；属革兰氏阴性菌的大肠埃希菌、铜绿假单胞菌、乙型副伤寒沙门菌；属真菌的白色念珠菌作为试验菌株。取上述各菌株浓度为约 10 CFU·mL⁻¹ 的菌悬液 0.1 mL，分别接种至 100 mL 的 TSB 中，置 32.5℃ 培养 24 h。平行进行 20 (n)次实验，结果见表 2。根据公式 LOD₅₀ = 0.7 d/ln[n/(n - y)]计算，d 为样品接受参考值，为试验菌接种后使阳性结果数占测试总数比例为 25%~75%加入的菌落数，即(菌落数 × 吸取体积) CFU·mL⁻¹。计算结果四舍五入取一位有效数字。经计算本检验方法的检测限为 1 CFU·mL⁻¹ (g⁻¹)。

Table 2. Limit of detection results
表 2. 检测限试验结果

菌株名称	金黄色葡萄球菌		蜡样芽孢杆菌		屎肠球菌		大肠埃希菌		铜绿假单胞菌		乙型副伤寒沙门菌		白色念珠菌	
平皿数	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
菌液计数结果	7	14	6	7	8	11	6	10	7	8	7	6	11	8
菌落数 (CFU·mL ⁻¹)	11		7		10		8		8		7		10	
阳性个数(y)	14		12		10		10		12		9		14	
LOD ₅₀ CFU·mL ⁻¹ (g ⁻¹)	$0.7 \times 11 \times 0.1/\ln [20/(20 - 14)] = 1$		$0.7 \times 7 \times 0.1/\ln [20/(20 - 12)] = 1$		$0.7 \times 10 \times 0.1/\ln [20/(20 - 10)] = 1$		$0.7 \times 8 \times 0.1/\ln [20/(20 - 10)] = 1$		$0.7 \times 8 \times 0.1/\ln [20/(20 - 12)] = 1$		$0.7 \times 7 \times 0.1/\ln [20/(20 - 9)] = 1$		$0.7 \times 10 \times 0.1/\ln [20/(20 - 14)] = 1$	

3.6. 重复性

取样品(编号为 S1) 6 份, 每份约 10 g, 加 TSB 至 100 mL, 振摇使分散, 作为 1:10 的供试液。分别取各 1:10 的供试液 10 mL 接种至 100 mL 的 TSB 中, 并加入 2.5 中各试验菌浓度为<100 CFU·mL⁻¹的各菌悬液 1 mL, 混匀, 置 32.5℃培养 24 h。取上述培养物直接划线于 TSA 平板上, 置 32.5℃培养 24 h。挑取 TSA 平板上的单菌落, 用全自动快速微生物质谱鉴定系统对菌落进行鉴定。均能检出目标菌株, 表明该测定方法重复性良好。

3.7. 耐用性

取样品(编号为 S1), 调节称样量 9 g 和 11 g, 加 TSB 至 100 mL, 振摇使分散, 作为 1:10 的供试液。分别上述制备好的 1:10 供试液 10 mL 接种至 100 mL 的 TSB 中, 并加入 2.5 中各试验菌浓度为<100 CFU·mL⁻¹的各菌悬液 1mL, 分别置 30℃、36℃培养温度培养, 培养时间设为 18 h 和 48 h, 各试验组均生长良好。检测结果与 2.6 一致, 表明本方法的耐用性良好。

3.8. 样品检测

Table 3. Sample testing results
表 3. 样品检测结果

菌株名称	样品编号、批号	用药途径、人群	需氧菌总数 (CFU·g ⁻¹)	霉菌和酵母菌 总数(CFU·g ⁻¹)	水分活度(a _w)	风险
蜡样芽孢杆菌 (<i>Bacillus cereus</i>)	S21、2409030B	口服、成人	<10	<10	0.58	低
	S34、240802	口服、成人	20	15	0.60	低
	S35、240801	口服、成人	10	<10	0.61	低
	S62、J23A003	口服、成人	150	<10	0.34	低
	S95、L1055	完整皮肤、成人	<10	<10	/	低
	S163、240701	口服、儿童	40	<10	0.40	中
	S217、20231001	口服、成人	30	<10	0.57	低
	S219、20231003	口服、成人	90	<10	0.57	低

续表

屎肠球菌 (<i>Enterococcus faecium</i>)	S243、202303	口服、成人	520	<10	0.59	低
	S269、BE48001	口服、成人	160	<10	0.57	低
	S83、23002	口服、成人	75	<10	0.38	低
	S84、23003	口服、成人	15	<10	0.36	低
	S174、20241201	口服、成人	<10	<10	0.58	低
	S231、F30003	口服、成人	<10	<10	0.60	低

注：“/”为未检测。

按照本研究建立的检验方法，对 274 批次样品进行检测。蜡样芽孢杆菌和苏云金芽孢杆菌为微生物质谱鉴定系统难以区分的微生物，检测出此两种菌后需使用 GB 4789.14-2014 食品安全国家标准食品微生物学检验蜡样芽孢杆菌检验中的确定鉴定进行确认。所有样品均未检出药典里规定不得检出的控制菌：大肠埃希菌、铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌、沙门菌、白色念珠菌和洋葱伯克霍尔德菌群；在中药材或中药饮片中常见的致病菌：阴沟肠杆菌、鲍曼不动杆菌、肺炎克雷伯菌、克罗诺杆菌、恶臭假单胞菌等也未检出，说明各企业中成药的生产过程均能有效去除相关的致病菌，企业的生产管理整体良好。分离出条件致病菌的微生物有 2 种：蜡样芽孢杆菌检出 10 批次，检出率为 3.6%；屎肠球菌检出 4 批次，检出率为 1.5%。结果见表 3。依据《中国药典》四部通则 9212 非无菌产品不可接受微生物风险评估与控制指导原则，根据微生物的潜在危害，药品特性：水分活度和微生物计数，给药途径和用药人群[1] [2] [11] [12]等综合研判，样品 S95 为儿童用药，判断风险为中等，其余样品风险为低。

4. 讨论

蜡样芽孢杆菌能够形成耐热、耐干燥的芽孢，对常规的防腐体系和灭菌工序有较强抵抗力，其致病性与含菌量密切相关，在即食食品的蜡样芽孢杆菌指标[13]中，安全标准满意等级为<10⁴ CFU/g。蜡样芽孢杆菌被检出样品为成人口服和用于完整皮肤用药的感染风险评为低风险；编号为 S163 样品为儿童用药，因儿童免疫力未成熟，感染风险评为中风险。屎肠球菌对抗生素有天然耐药，为人体肠道正常菌群，但可以通过其他途径感染血液、尿道等组织。检出样品均为口服制剂，故风险评为低风险。

本研究建立了以非选择性培养基胰酪大豆胨液体培养基和胰酪大豆胨琼脂培养基对中成药中的微生物进行恢复、增菌和分离，随后使用微生物质谱鉴定系统进行快速鉴定的监测方法。这是除了按照《中国药典》的要求进行控制菌检查以外，实验室内部为了加强对药品不可接受微生物的监测建立方法。本方法简单、高效、实验使用耗材成本低，对于监测样品所含的微生物种类，提高条件致病菌的检出，促进企业加强对药品不可接受微生物的控制和管理有积极的意义。

本方法选用 TSA、TSB 富营养成分的培养基对样品的微生物进行需氧培养，能满足大部分有致病性微生物的营养条件，但对于某些有特殊培养条件的微生物(如需厌氧条件、对营养需求不高)会有检测的不足之处。再者，某些微生物使用微生物质谱鉴定系统鉴定会难以区分，如蜡样芽孢杆菌菌群、洋葱伯克霍尔德菌菌群、鲍曼-醋酸钙不动杆菌复合体等，需使用其他微生物鉴定系统或生化鉴定进行进一步确认。

基金项目

广东省药品监督管理局科技创新项目(2024TDB02)；广东省药品检验所科研项目(SN2024005)。

参考文献

- [1] 中华人民共和国药典: 2025 年版. 四部[EB/OL].
<https://2025.chp.org.cn/#/item?bookId=4&entryId=5958>, 2025-12-05.
- [2] 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.
- [3] 孙晓朋, 张丹, 刘菊, 等. 中药饮片虎掌南星微生物污染状况分析[J]. 中国药品标准, 2023, 24(1): 25-31.
- [4] 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.
- [5] 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(5): 321-325.
- [6] 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.
- [7] 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(5): 1153-1157.
- [8] 李趣嫦, 江艳芳, 赖珊, 等. 一种中药丸剂生产全链条微生物负载的研究[J]. 药物分析杂志, 2024, 44(8): 1394-1399.
- [9] 范一灵, 冯震, 钟玮, 等. 无菌药品生产企业核心区微生物污染调查与分析[J]. 中国药事, 2014, 31(6): 586-590.
- [10] 中华人民共和国药典: 2020 年版. 四部[EB/OL].
<https://ydz.chp.org.cn/#/item?bookId=4&entryId=5501>, 2023-10-07.
- [11] 王似锦, 余萌, 王杠杠, 等. 非无菌药品中不可接受微生物的控制与风险评估[J]. 中国药事, 2020, 34(9): 1028-1039.
- [12] 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): 584-587, 610.
- [13] DBS 44/006—2024 食品安全地方标准 餐饮服务非预包装即食食品微生物限量[EB/OL].
<https://wsjkw.gd.gov.cn/attachment/0/556/556352/4475145.pdf>, 2024-08-06.