

中药饮片有害微生物负载及鉴定技术研究进展

陈玲^{1,2}, 陈维¹, 刘振杰¹, 曾嘉辉¹, 郭伟鹏¹, 吴清平¹, 张菊梅^{*1}

1 广东省科学院微生物研究所 广东省微生物分析检测中心 华南应用微生物国家重点实验室 广东省微生物安全与健康重点实验室, 广东 广州 510070

2 华南农业大学食品学院, 广东 广州 510642

陈玲, 陈维, 刘振杰, 曾嘉辉, 郭伟鹏, 吴清平, 张菊梅. 中药饮片有害微生物负载及鉴定技术研究进展[J]. 微生物学通报, 2022, 49(7): 2838-2848

Chen Ling, Chen Wei, Liu Zhenjie, Zeng Jiahui, Guo Weipeng, Wu Qingping, Zhang Jumei. Progress on contamination and identification methods of harmful microorganisms in Chinese herbal medicines[J]. Microbiology China, 2022, 49(7): 2838-2848

摘要: 中药饮片在种植、采收、加工和储藏等过程中均有可能受到多种微生物的污染, 特别是有害微生物如致病细菌、产毒真菌等的存在会影响中药饮片的安全性。本文综述了近年来中药饮片有害微生物的污染情况, 比较不同国家药典对中药饮片微生物限度和真菌毒素限量的差异, 归纳当前用于不同微生物鉴定方法的适用性, 以期为中药饮片质量安全研究工作提供参考。

关键词: 中药饮片; 有害微生物; 污染; 微生物鉴定

Progress on contamination and identification methods of harmful microorganisms in Chinese herbal medicines

CHEN Ling^{1,2}, CHEN Wei¹, LIU Zhenjie¹, ZENG Jiahui¹, GUO Weipeng¹, WU Qingping¹, ZHANG Jumei^{*1}

1 Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Safety and Health, State Key Laboratory of Applied Microbiology Southern China, Guangdong Detection Center of Microbiology, Institute of Microbiology, Guangdong Academy of Sciences, Guangzhou 510070, Guangdong, China

2 College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, Guangdong, China

Abstract: Chinese herbal medicines may be contaminated with microorganisms (pathogenic bacteria and mycotoxigenic fungi) during cultivation, harvesting, processing, and storage, which causes spoilage and consequently affects the safety of herbal medicines. This study summarized the microbial

基金项目: 国家重点研发计划(2017YFC1600403); 广东省科学院实施创新驱动发展能力建设专项(2019GDASYL-0201001)

Supported by: National Key Research and Development Program of China (2017YFC1600403); GDAS' Project of Science and Technology Development (2019GDASYL-0201001)

*Corresponding author: E-mail: zhangjm926@126.com

Received: 2021-10-15; Accepted: 2021-12-04; Published online: 2022-01-07

contamination of common herbal medicines in recent years, and compared the limits of microbial and mycotoxin in pharmacopeias of different countries. Moreover, we reviewed the detection and identification methods of microorganisms in herbal medicines to provide a reference for similar research.

Keywords: Chinese herbal medicine; harmful microorganisms; contamination; identification of microorganism

中药饮片是指药材通过炮制加工而成且可直接用于中医临床或制剂生产使用的产品,其主要源自天然植物、动物和矿物等^[1]。中药饮片属于药材,药材在欧洲被称为植物药,美国则归为营养补充剂,日本称为生药^[2]。目前,我国对中医药产业高度重视,中药饮片作为中药产业链重要的一环,已制定较为完善的饮片炮制、检测和限量标准,但是中药饮片微生物污染已成为普遍现象,特别是病原菌及其有毒代谢物的存在直接影响饮片的质量稳定和安全。

本文汇总我国中药饮片微生物污染的研究,关注有害微生物负载问题,结合不同国家药典对中药饮片的微生物和真菌毒素限量规定分析,并综述近年来用于微生物鉴定的技术发展和应用范围,以期科学制定中药饮片微生物检验标准及开展中药质量安全研究提供依据。

1 中药饮片的微生物污染

在我国,中药饮片需求量大,有些品种例如枸杞、菊花、阿胶、人参等还可用于食品。然而每年关于中药饮片受微生物污染的研究报道层出不穷,2015年,范一灵等^[3]收集上海市场上常见的10种94批次中药饮片进行微生物污染调查,结果显示饮片中需氧菌总数为 10^1-10^8 CFU/g,霉菌和酵母总数为 10^1-10^7 CFU/g,耐热菌的检出率高达76.6%,其中一批检出大肠埃希菌。2020年,范一灵等^[4]检测了100批中药饮片,

其需氧菌总数为 10^3-10^6 CFU/g,霉菌和酵母总数为 10^1-10^4 CFU/g,耐热菌的检出率为61.0%;对耐热菌采用16S rRNA基因序列鉴定均为枯草芽胞杆菌。孙莺等^[5]重点考察了甘肃省3种道地药材黄芪、甘草、板蓝根共90批次的微生物污染,发现黄芪的微生物负载水平最高,有2批甘草饮片检出沙门氏菌。Chen等^[6]对党参、黄芪、红枣等13种常见中药的研究发现,83.3%的中药受到真菌污染,分离到的优势真菌主要由曲霉、青霉、根霉和木霉组成。国外针对中药微生物污染的调查研究较少,Katerere等^[7]对南非市场销售的16个药材进行分析,有15个样本受到曲霉、青霉、镰刀菌不同程度的污染,并且13个样本检出伏马毒素。Abou^[8]在埃及收集了303份样品,其中11种叶类药材、6种果类药材、3种花类药材,所有样品均受到真菌污染,以曲霉、镰刀菌和青霉为优势菌。

分析以往的研究报道,国内外中药饮片绝大多数携带微生物,常见食源性致病菌大肠埃希菌、沙门氏菌及产毒霉菌也时有检出,虽然我国药品监管部门加大对中药饮片监督检查和抽检力度,对违法违规企业和不合格产品进行曝光和处罚,中药饮片微生物合格率逐年上升,总体质量状况也有所好转,但对不同品种饮片负载的特有或潜在致病菌或产毒真菌的调研不够深入,这对中药饮片质量提升、产业健康发展及人们用药安全造成阻碍。

2 中药饮片的产毒真菌及真菌毒素

除了微生物负载问题,由霉菌产生的真菌毒素污染是中药饮片外源性污染的另一突出问题。真菌毒素是由特定真菌产生的具有毒性的次级代谢产物,可对人和动物的肝脏、肾脏、神经组织等造成损害^[9]。赵祥升等^[10]将 2000 年以来国内外发表的中药的黄曲霉毒素 B₁ (aflatoxin B₁, AFB₁)检测为阳性定量数据汇总,发现中药污染最为普遍的真菌毒素是 AFB₁, 柏子仁、延胡索、莲子这 3 个品种的黄曲霉毒素 B₁ 超标率高,检出值为 5.01–1 268.60 μg/kg。Waskiewicz 等^[11]采集波兰市场 79 批植物药和香料进行真菌毒素筛查,结果显示赭曲霉毒素 A (ochratoxin A, OTA)的检出率高达 49%。叶林链等^[12]从 34 批肉豆蔻中检出 7 批残留 OTA,检出值为 2.9–36.7 μg/kg,并且分离到一株产毒曲霉为菌核曲霉。Chen 等^[6]对 48 份中药进行 6 种真菌毒素筛查发现, AFB₁、OTA 和桔青霉素(citrinin, CIT)的检出率分别为 70.8%、29.2%和 8.3%,党参和黄芪同时残留 OTA 和 CIT;此外还分离到 8 株产毒霉菌,分别是 3 株桔青霉、1 株波兰青霉、1 株 *Penicillium sacculum*、1 株赭曲霉、1 株谢瓦曲霉和 1 株黄曲霉。Han 等^[13]研究显示,35 份中药材中 50%以上的样品检出伏马毒素(fumonisin, FB),污染水平为 0.58–88.95 μg/kg,其中种子类药材桃仁、酸枣仁、蔓荆子等 FB 残留较高。Yue 等^[14]在 2 份薏苡仁和 1 份保和丸检出呕吐毒素,又称脱氧雪腐镰刀菌烯醇(deoxynivalenol, DON),保和丸成分中包含大麦芽,其与薏苡仁都来自禾本科。秦苒茂^[15]针对 9 种常用植物中药(板蓝根、白芍、铁皮石斛、金钗石斛、大青叶、蒲公英叶、薄荷叶、车前草叶、亳菊)检测真菌毒素污染情况,白芍样本残留玉米赤霉烯酮(zearalenone, ZEN),检出值

为 0.76–4.99 μg/kg。邱文倩等^[16]对福建省售的 50 份薏苡仁进行常见真菌毒素筛查发现, ZEN 和 DON 的检出率分别为 34.0%和 33.0%。

不同属性的饮片中种子果实类、根及根茎类饮片检出真菌毒素的频次相对较高(表 1),其中黄曲霉毒素主要由黄曲霉和寄生曲霉等真菌产生,而黄曲霉最佳产毒的温度范围是 28–30 °C,最佳 pH 值为 3.4–5.5^[10];产 OTA 的真菌除常见的赭曲霉、炭黑曲霉外,产黄青霉、*Penicillium glycyrrhizicola*、波兰青霉^[17–18]等青霉也被报道可产生 OTA, OTA 是一种强肝、肾毒的化合物,其与黄曲霉毒素同时存在可增大增强毒害作用;镰刀菌属则可产生多种毒素如 FB、T-2 毒素等单端孢霉烯族毒素和 ZEN。从真菌毒素检测转变为检测产毒真菌的存在,一方面可提示饮片受到真菌毒素污染风险和可能污染的毒素类别,另一方面可前置化干预产毒真菌对饮片的污染,从源头控制毒素的产生。

3 药典中药饮片微生物及真菌毒素的限量规定

目前,《中国药典》2020 年版(ChP2020)^[19]、《美国药典》43 版(USP43)^[20]、《欧洲药典》10.0 版(EP10.0)^[21]、《日本药典》17 版(JP17)^[22]中均收载中药饮片(含类似中药饮片)的微生物检查方法及限量标准,各国药典涉及中药饮片微生物部分限度标准见表 2。USP43“2023”中对中药的产品做了比较详细的划分,有干燥或经磨粉植物、酊剂、炮制/煎煮等 7 个类别,分类清晰,其中对炮制/煎煮产品微生物限量要求最高;此外,还提出企业需主动评估过程控制中不可接受微生物的理念。EP10.0“5.1.8”将中药分为 3 类:需沸水处理的样品(A)、经工艺处理的样品(B),经工艺处理后不能达到 B 要求的样

表 1 中药饮片常见真菌毒素分布情况^[6,10,12-18]Table 1 Contamination of common mycotoxins in Chinese herbal medicine^[6,10,12-18]

真菌毒素 Mycotoxin	主要来源真菌 Mycotoxigenic fungal species	污染饮片品种 Types of contaminated Chinese herbal medicines
黄曲霉毒素 Aflatoxin	黄曲霉 <i>Aspergillus flavus</i> 寄生曲霉 <i>Aspergillus parasiticus</i>	大枣、肉豆蔻、柏子仁、莲子、薏苡仁、酸枣仁、槟榔、山茱萸 <i>Jujubae fructus, Myristicae semen, Platycladi semen, Nelumbinis plumula, Coicis semen, Ziziphi spinosae semen, Arecae semen, Corni fructus</i> 远志、延胡索、白茅根、甘草 <i>Polygalae radix, Corydalis rhizoma, Imperatae rhizoma, Glycyrrhizae radix et rhizoma</i>
赭曲霉毒素 Ochratoxin	赭曲霉 <i>Aspergillus ochraceus</i> 炭黑曲霉 <i>Aspergillus carbonarius</i> 疣孢青霉 <i>Penicillium verrucosum</i>	肉豆蔻 <i>Myristicae semen</i> 甘草、黄芪、党参 <i>Glycyrrhizae radix et rhizoma, Scutellariae radix, Codonopsis radix</i>
伏马毒素 Fumonisin	拟轮生镰刀菌 <i>Fusarium verticillioides</i> 层出镰刀菌 <i>Fusarium proliferatum</i>	桃仁、酸枣仁、蔓荆子、苦杏仁 <i>Persicae semen, Ziziphi spinosae semen, Viticis fructus, Armeniacae semen amarum</i>
T-2 毒素 T-2 toxin	拟枝孢镰刀菌 <i>Fusarium sporotrichioides</i>	薏苡仁 <i>Coicis semen</i>
脱氧雪腐镰刀菌烯醇 Deoxynivalenol	禾谷镰刀菌 <i>Fusarium graminearum</i> 黄色镰刀菌 <i>Fusarium culmorum</i>	薏苡仁 <i>Coicis semen</i>
玉米赤霉烯酮 Zearalenone	禾谷镰刀菌 <i>Fusarium graminearum</i>	薏苡仁 <i>Coicis semen</i> 白芍 <i>Paeoniae radix alba</i>

表 2 药典中药饮片微生物的限度

Table 2 Limits of microorganisms in Chinese herbal medicine among pharmacopeia

药典 Pharmacopeia	分类 Classification	微生物限量 Limits of microorganisms				
		TAMC Total aerobic microbial count ^a	TYMC Total yeast and mold count ^a	耐胆盐革兰氏阴性菌 ^a Bile salts tolerance of Gram-negative bacteria	大肠埃希菌 <i>Escherichia coli</i>	沙门氏菌 <i>Salmonella</i>
USP43	炮制/煎煮产品 Processed/Fried products	1×10 ²	1×10	未作规定 Not provided	未作规定 Not provided	未作规定 Not provided
EP10.0	A	1×10 ⁷	1×10 ⁵	未作规定 Not provided	1×10 ^{3a}	不得检出 ^c Not detected
	B	1×10 ⁴	1×10 ²	1×10 ²	不得检出 ^b Not detected	不得检出 ^c Not detected
	C	1×10 ⁵	1×10 ⁴	1×10 ⁴	不得检出 ^b Not detected	不得检出 ^c Not detected
JP17	I	1×10 ⁵	1×10 ⁴	1×10 ⁴	不得检出 ^b Not detected	不得检出 ^c Not detected
	II	1×10 ⁷	1×10 ⁵	未作规定 Not provided	1×10 ^{3a}	不得检出 ^c Not detected
ChP2020	直接口服及泡服饮片 Oral products	1×10 ⁵	1×10 ³	1×10 ⁴	不得检出 Not detected	不得检出 ^c Not detected

Note: ^a: CFU/g or CFU/mL; ^b: 1 g or 1 mL; ^c: 25 g or 25 mL.

品(C)。JP17 则分为两类:经沸水处理的样品(I)和无需提取工艺直接使用的样品(II)。ChP2020 通则 1107 征求意见稿中将饮片分为“直接口服及泡服”和“煎煮类”两类进行微生物控制,考虑到饮片的特殊性和业界的争议,正式稿删除了“煎煮类”饮片的微生物限度,仅保留“直接口服及泡服饮片”的微生物限度要求,新增通则 1108 “中药饮片微生物限度检查法”。

不同国家药典对真菌毒素的限量(表 3)略有差异,USP43 和 EP10.0 对 AFB₁ 的限量最严格,为 2.0 μg/kg,ChP2020 通则四部 2351 真菌

毒素测定法增加了真菌毒素的测定方法,由原来的 AFB₁、AFB₂、AFG₁ 和 AFG₂ 这 4 种毒素增加到了现在的 AFB₁、AFB₂、AFG₁、AFG₂、OTA、DON、ZEN、展青霉素(patulin, PAT)、FB₁、FB₂ 及 T-2 毒素 11 种毒素的测定,针对中药饮片的黄曲霉毒素的限量要求也扩大了监控范围,由 19 种中药增加到了 24 种,薏苡仁增加 ZEN 的限量要求。

虽然 ChP2020 已新增中药饮片微生物检测方法、限度标准、真菌毒素测定方法,但是对比其他 3 部药典还有待进一步完善,可结合科

表 3 药典对真菌毒素的限量

Table 3 Limits of mycotoxins in Chinese herbal medicine among pharmacopeia

药典	真菌毒素	限量	对象
Pharmacopeia	Mycotoxin	Limits (μg/kg)	Target
USP43	AFB ₁	2.0	营养补充剂
	AFs ^d	4.0	Dietary supplements
EP10.0	AFB ₁	2.0	植物药
	AFs ^d	4.0	Herbal drugs
	OTA	20.0	甘草 <i>Glycyrrhizae radix et rhizoma</i>
JP17	AFs ^d	10.0	生药 Natural medicines
ChP2020	AFB ₁	5.0	全蝎、蜈蚣、槟榔、酸枣仁、薏苡仁、桃仁、僵蚕、水蛭、地龙、大枣、决明子、莲子、陈皮、肉豆蔻、胖大海、柏子仁、麦芽、使君子、远志、延胡索(元胡)、蜂房、九香虫、马钱子、土鳖虫
	AFs ^d	10.0	<i>Scorpio, Scolopendra, Arecae semen, Ziziphi spinosae semen, Coicis semen, Persicae semen, Bombyx batryticatus, Hirudo, Pheretima, Jujubae fructus, Cassiae semen, Nelumbinis plumula, Citri reticulatae pericarpium, Myristicae semen, Sterculiae lychnophorae semen, Platycladi semen, Hordei fructus germinatus, Quisqualis fructus, Polygalae radix, Corydalis rhizoma, Propolis, Aspongopus, Strychni semen, Eupolyphaga steleophaga</i>
	ZEN	500.0	薏苡仁
ChP2015 ^[23]	AFB ₁	5.0	全蝎、蜈蚣、槟榔、酸枣仁、薏苡仁、桃仁、僵蚕、水蛭、地龙、大枣、决明子、莲子、陈皮、肉豆蔻、胖大海、柏子仁、麦芽、使君子、远志
	AFs ^d	10.0	<i>Scorpio, Scolopendra, Arecae semen, Ziziphi spinosae semen, Coicis semen, Persicae semen, Bombyx batryticatus, Hirudo, Pheretima, Jujubae fructus, Cassiae semen, Nelumbinis plumula, Citri reticulatae pericarpium, Myristicae semen, Sterculiae lychnophorae semen, Platycladi semen, Hordei fructus germinatus, Quisqualis fructus, Polygalae radix</i>

Note: ^d: Total of AFB₁, AFB₂, AFG₁ and AFG₂.

学大数据分析和实际应用,逐步对风险高的中药饮片管控纳入药典,同时制定合理科学的限度标准,有效保障中药饮片质量安全。

4 微生物鉴定技术

我国中药饮片微生物检测主要包括需氧菌总数、霉菌和酵母菌总数、耐热菌总数、耐胆盐革兰氏阴性菌、大肠埃希菌和沙门氏菌共6个项目,其中定量测定一般采用平皿计数法,它是权威的标准方法;为了提高检测效率,快速测试片成为了较好的替代或补充选择,研究者们比较两种方法在检测食品、饮料、化妆品、医疗器械等的卫生指示菌结果无显著性差异^[24-25]。除了测试片外,腺苷三磷酸(adenosine triphosphoric acid, ATP)发光法被用于水质和生产环境微生物监测,使得检测时间大大缩短;免疫磁珠分离技术在富集和分离病原菌中发挥积极作用,可减少背景干扰、提高检测灵敏度;PCR检测也已纳入国家标准、出入境检验检疫行业标准,以及辅助致病菌验证、分型、毒力基因测定。

按照法规要求进行微生物检验,虽然可获得供试品微生物总体污染程度和特定微生物的检出信息,但不能全面掌握有害微生物的安全风险。为了更好地识别饮片有害微生物污染类群、变异情况和潜在危害,应该对典型污染菌进行种、属鉴定甚至菌株分型。目前常用的微生物鉴定方法包括3种。

4.1 基于传统表型方法

表型方法是当前食品药品检验机构及国家卫生监管部门最常用的主流微生物检测方法,它包括观察形态学特征和进行生理生化实验^[26],其中形态学鉴定是依据国内外权威的文献或国家标准的方法进行实验操作,在特定培养条件下,根据菌种稳定的、独特的形态特征(宏观和

微观特征)与分类检索表进行对比获得结果。生理生化实验的原理是检测微生物对各种基质的代谢作用及其代谢产物,从而鉴别其种属。常用的API、VITEK 2 Compact 鉴定系统^[27]可用于细菌和酵母菌鉴定。Biolog 微生物鉴定系统^[28]除用于鉴定细菌和酵母菌外,还可鉴别700多种丝状真菌。这些鉴定系统都是在生理生化试验的基础上,结合数学模型建立微生物种属生化指纹图谱数据库,只需将待测微生物的生化图谱与数据库比对,即可得到鉴定结果。

传统表型鉴定方法可操作性强,适用于实验室根据表型鉴定所提供的信息来判断供试品污染的微生物种类(细菌、霉菌或酵母菌)和获得常见微生物种属结果,但其有几个突出的缺点:(1)只适合体外纯培养的微生物,对于缓慢生长或特殊培养的微生物尤为耗时;(2)对实验人员要求较高,特别是真菌的形态学鉴定需要人员经验丰富且有菌种分类学背景;(3)某些受损菌株生化特征不典型,同属的个别种生化反应相近,会造成错误鉴定或鉴定率低等;(4)无法鉴别未列在数据库的菌种。

4.2 基于物理化学方法

随着科技的进步和学科交叉的发展,在1991年,Naumann等^[29]就指出傅里叶变换红外光谱(Fourier transform infrared spectroscopy, FT-IR)技术可用于微生物判别、分类和鉴定,该技术反映的是菌体所组成成分的化学键的振动情况,提供其组成成分的光谱定量信息,包括样本中核酸、蛋白质、碳水化合物的构成,该法具有高通量及无损检测的优点。王静^[30]利用FT-IR技术检测13种常见的食源性致病菌,并建立相应的FT-IR光谱/导数谱数据库。然而,仪器昂贵、库内数据少等因素限制了FT-IR在微生物鉴定领域的应用。

近年基质辅助激光解吸电离飞行时间质

谱法(matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry, MALDI-TOF MS)是最具代表性的微生物快速鉴定技术, 该方法通过检测微生物胞内核糖体蛋白, 经软件处理得到蛋白指纹图谱并与标配数据库进行比对, 在几分钟之内完成微生物种、属水平的鉴定。其具有速度快、准确、高通量的特点, 适用于细菌、古细菌和真菌的快速鉴定^[31-32], 目前能用于鉴定超过 2 000 种的常见细菌。2017 年 4 月, 美国临床实验室标准化协会(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI)发布了第一版使用 MALDI-TOF MS 方法鉴定微生物的指导方针 CLSI M58, 标志着质谱技术用于微生物常规鉴定已成为普遍认可的主流方法, 并且走上了标准化的道路。除了在临床、食品、工业等领域应用广泛, 也有学者将 MALDI-TOF MS 法应用于中药饮片的微生物污染评价。甘永琦等^[33]运用 MALDI-TOF MS 法鉴定在黄芪等 7 个品种 40 批样品分离到的 23 株细菌, 分别归属于芽胞杆菌属、短状芽胞杆菌属、类芽胞杆菌属和土壤芽胞杆菌属。然而中药饮片还易受到真菌污染, 虽然有开发 MALDI-TOF MS 商品化的真菌数据库, 但涵盖范围窄、前处理烦琐、判定标准苛刻等, 其鉴定霉菌效果往往不佳^[34]。李艳君等^[35]通过对 266 株临床标本来源的霉菌进行纯培养后提取蛋白, 收集蛋白谱图构建本地数据库, 明显提高了 MALDI-TOF MS 法鉴别霉菌的能力。因此, MALDI-TOF MS 法对于一些亲缘关系较近的细菌、丝状真菌等的鉴定仍然具有较大挑战, 一方面可自建或拓展数据库来更好地保障微生物鉴定的准确性并降低失败率; 另一方面通过改进算法提高分辨率^[36]。

4.3 基于分子生物学方法

PCR 技术的兴起是生物界的重要变革。如今 PCR 技术在微生物的应用已从最初的定性检

测发展到现在的定量分析, 常见的有常规 PCR、多重 PCR、实时荧光定量 PCR^[37]、基因芯片、数字 PCR^[38]等, 还衍生出分子分型方法, 如脉冲场凝胶电泳(pulsed field gel electrophoresis, PFGE)、核糖体分型、多位点序列分型(multilocus sequence typing, MLST)等^[39]。对比传统的表型方法, 基因型鉴定具有样本量少、准确度高的优点, 其不受生长培养基或分离物活性的影响, 从遗传进化角度阐明微生物种群的分类学关系, 更值得信赖。

分子生物学法已被广泛用于大部分微生物鉴定, 例如 16S rRNA 基因、ITS 区、26S rRNA 基因 D1/D2 区被公认为细菌、霉菌和酵母进化的分子标尺, 对这些靶基因进行 PCR 扩增、电泳分离扩增产物, 测序后与专用数据库进行比对, 结合系统发育分析得到未知菌种属信息。然而, 单个靶基因的序列分析在某些属不同种、不同血清型细菌、同种不同亚种、个别复合体例如洋葱伯克霍尔德复合体(*Burkholderia cepacia* complex, BCC)等的微生物鉴别能力有限, 建议使用多个靶基因串联甚至全基因组测序来提高鉴定准确度。宋明辉等^[40]基于 *femA* 与 16S rRNA 基因的串联组合准确鉴别了 18 种葡萄球菌; 尚玉婷^[41]挖掘了 81 个沙门氏菌新靶标, 可用于不同种/血清群/血清型沙门氏菌的检测; Su 等^[42]采用核糖体大亚基(ribosomal large subunit, LSU)、编码 RNA 聚合酶 II 的第二大亚基(*RPB2*)、转录延长因子 1 α (*TEF1 α*)基因序列多基因鉴别 *Torulaceae* 的主要成员, 而 ITS 区、 β -微管蛋白基因(*BenA*)、钙调节蛋白基因(*CaM*)、*RPB2* 序列联合分析则在丝状真菌青霉、曲霉属种水平鉴定效果佳^[43-44]。

随着测序技术日趋成熟和成本降低, 高通量测序技术逐渐用于中药饮片微生物菌群的研究, 基于 16S rRNA 基因/ITS 扩增子测序可探

究微生物多样性、菌群丰度和差异、微生物与环境之间关系等。李琼琼等^[45]采用 16S rRNA 基因扩增子技术对柴胡、黄芪、枸杞子、铁皮枫斗、桔梗、土鳖虫合计 60 批中药饮片进行微生物类群分析, 获得 6 个门 27 个属的微生物信息, 检出肺炎克雷伯氏菌、铜绿假单胞菌等重要的条件致病菌, 提示中药饮片污染微生物具有一定的致病风险。李婷等^[46]利用 ITS 扩增子技术从 7 份柏子仁样品得到 3 门 18 纲 40 目 82 科 120 属共 191 种真菌, 较为真实地反映了柏子仁表面微生物群落组成及相对丰度情况。在采用扩增子测序技术时, 合适的引物扩增标记基因是关键, 可根据研究目的选择覆盖度高、特异性好的引物来确保生物信息数据的可靠。此外, 有些饮片经炮制会导致部分微生物失活, 而高通量测序通常是对供试品总 DNA 进行测序分析, 采用单一方法分析饮片微生物污染风险可能会存在一定偏差, 建议同时与传统培养法相结合, 更科学地掌握饮片负载微生物实际情况, 还可获得宝贵的菌种资源。

5 结语

我国中药饮片种类繁多、来源广泛, 本身携带微生物, 当加工过程处理不当易造成微生物繁殖、致病菌负载、毒素积累等, 会严重影响饮片质量和用药安全。加大中药饮片的微生物污染调查, 掌握不同属性(如药材基原、采收部位等)、不同地域来源、加工各环节的饮片微生物数量、种类和检出频率, 有助于合理制定饮片微生物限度标准; 选择合适、先进的技术快速检测和精准鉴定饮片及其加工过程的有害微生物, 从而评估饮片风险、追踪污染来源并及时采取控制措施; 严格把控饮片全产业链的监管, 不断健全质量控制体系, 保障饮片安全, 提高饮片品质, 从而促进中药产业健康、有序发展。

REFERENCES

- [1] Enayatifard R, Asgarirad H, Kazemi-sani B. Microbial quality of some herbal solid dosage forms[J]. African Journal of Biotechnology, 2010, 9(11): 1701-1705
- [2] 范一灵, 李琼琼, 秦峰, 刘浩, 杨美成. 《美国药典》《欧洲药典》《日本药典》与《中国药典》中中药饮片微生物限度检查及标准的比较研究[J]. 中国药房, 2020, 31(22): 2695-2700
Fan YL, Li QQ, Qin F, Liu H, Yang MC. Comparative study of microbial limit test and criteria of TCM decoction pieces among United States Pharmacopeia, European Pharmacopeia, Japanese Pharmacopeia and Chinese Pharmacopeia[J]. China Pharmacy, 2020, 31(22): 2695-2700 (in Chinese)
- [3] 范一灵, 李琼琼, 房蕊, 杨美成. 上海地区 10 种中药饮片微生物污染情况研究[J]. 中草药, 2015, 46(13): 1908-1913
Fan YL, Li QQ, Fang R, Yang MC. A survey of microbial contamination for ten processed pieces of Chinese materia medica in Shanghai[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2015, 46(13): 1908-1913 (in Chinese)
- [4] 范一灵, 李琼琼, 杨燕, 李昊, 刘浩, 秦峰, 杨美成. 中药饮片及中药代煎剂中微生物污染调查与分析[J]. 药物分析杂志, 2020, 40(10): 1828-1836
Fan YL, Li QQ, Yang Y, Li H, Liu H, Qin F, Yang MC. A survey and analysis of microbial contamination for processed Chinese materia medica and pre-packaged decocted products[J]. Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis, 2020, 40(10): 1828-1836 (in Chinese)
- [5] 孙莺, 王玉梅, 何晓英, 李莉, 牟建平, 徐勤科, 王亚丽, 谢亲建, 杨平荣. 甘肃省道地药材黄芪、甘草、板蓝根中药饮片的微生物污染状况研究[J]. 卫生职业教育, 2020, 38(22): 119-122
Sun Y, Wang YM, He XY, Li L, Mou JP, Xu QK, Wang YL, Xie QJ, Yang PR. Study on microbial contamination of *Astragali*, *Glycyrrhizae* and *Isatidis* in Gansu province[J]. Health Vocational Education, 2020, 38(22): 119-122 (in Chinese)
- [6] Chen L, Guo WP, Zheng YQ, Zhou JZ, Liu TT, Chen W, Liang DQ, Zhao MP, Zhu YD, Wu QP, et al. Occurrence and characterization of fungi and mycotoxins in contaminated medicinal herbs[J]. Toxins, 2020, 12(1): 30
- [7] Katerere DR, Stockenström S, Thembo KM, Rheeder JP, Shephard GS, Vismar HF. A preliminary survey of

- mycological and fumonisin and aflatoxin contamination of African traditional herbal medicines sold in South Africa[J]. *Human & Experimental Toxicology*, 2008, 27(11): 793-798
- [8] Abou Donia MA. Microbiological quality and aflatoxinogenesis of Egyptian spices and medicinal plants[J]. *Global Veterinaria*, 2008, 2(4): 175-181
- [9] Fleurat-Lessard F. Integrated management of the risks of stored grain spoilage by seedborne fungi and contamination by storage mould mycotoxins — an update[J]. *Journal of Stored Products Research*, 2017, 71: 22-40
- [10] 赵祥升, 应光耀, 魏建和, 孙华, 杨美华. 中药中黄曲霉毒素 B₁ 污染概况[J]. *中国药物警戒*, 2018, 15(10): 608-616, 622
- Zhao XS, Ying GY, Wei JH, Sun H, Yang MH. Overview of aflatoxin B₁ contamination in traditional Chinese medicine[J]. *Chinese Journal of Pharmacovigilance*, 2018, 15(10): 608-616, 622 (in Chinese)
- [11] Waśkiewicz A, Beszterda M, Bocianowski J, Goliński P. Natural occurrence of fumonisins and ochratoxin A in some herbs and spices commercialized in Poland analyzed by UPLC-MS/MS method[J]. *Food Microbiology*, 2013, 36(2): 426-431
- [12] 叶林链, 毛丹, 王少敏, 周恒, 刘贤贤, 季申. 肉豆蔻中赭曲霉毒素的测定及赭曲霉毒素产毒菌的分离鉴定[J]. *分析试验室*, 2021, 40(1): 7-11
- Ye LL, Mao D, Wang SM, Zhou H, Liu XX, Ji S. Determination of ochratoxins in nutmeg as well as isolation and identification of ochratoxin-producing fungus[J]. *Chinese Journal of Analysis Laboratory*, 2021, 40(1): 7-11 (in Chinese)
- [13] Han Z, Ren YP, Liu XS, Luan LJ, Wu YJ. A reliable isotope dilution method for simultaneous determination of fumonisins B₁, B₂ and B₃ in traditional Chinese medicines by ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *Journal of Separation Science*, 2010, 33(17/18): 2723-2733
- [14] Yue YT, Zhang XF, Pan JY, Ou-Yang Z, Wu J, Yang MH. Determination of deoxynivalenol in medicinal herbs and related products by GC-ECD and confirmation by GC-MS[J]. *Chromatographia*, 2010, 71(5/6): 533-538
- [15] 秦筱茂. 九种药材中真菌种类及污染真菌毒素初探[D]. 北京: 北京协和医学院硕士学位论文, 2011
- Qin XM. Studies on fungal species and related mycotoxin contamination in 9 Chinese medicinal herbs[D]. Beijing: Master's Thesis of Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, 2011 (in Chinese)
- [16] 邱文倩, 林坚, 陆秋艳. 福建省售薏苡仁常见真菌毒素污染状况研究[J]. *海峡预防医学杂志*, 2019, 25(6): 8-12
- Qiu WQ, Lin J, Lu QY. Study on mycotoxins contamination status of *Coix* seed in Fujian markets[J]. *Strait Journal of Preventive Medicine*, 2019, 25(6): 8-12 (in Chinese)
- [17] Chen AJ, Huang LF, Wang LZ, Tang D, Cai F, Gao WW. Occurrence of toxigenic fungi in ochratoxin A contaminated liquorice root[J]. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 2011, 28(8): 1091-1097
- [18] Chen AJ, Tang D, Zhou YQ, Sun BD, Li XJ, Wang LZ, Gao WW. Identification of ochratoxin A producing fungi associated with fresh and dry liquorice[J]. *PLoS One*, 2013, 8(10): e78285
- [19] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 2020 年版 四部. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 171-175
- State Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China[S]. Volume IV-2020. Beijing: China Medical Science and Technology Press, 2020: 171-175 (in Chinese)
- [20] U.S. Pharmacopeial Convention. United State Pharmacopoeia[S/OL]. 43-NF38. <https://www.uspnf.com/notices/usp-nf-final-print-edition>
- [21] European Pharmacopoeia Commission. European Pharmacopoeia[S]. 10.0 ed. European Directorate for Quality Medicines, 2019: 68-97
- [22] Pharmaceuticals and Medical Devices Agency of Japan. Japanese Pharmacopoeia[S]. 17th ed. Tokyo: the Ministry of Health, Labor and Welfare, 2016: 138-147
- [23] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 2015 年版. 北京: 中国医药科技出版社, 2015
- State Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China[M]. Beijing: China Medical Science and Technology Press, 2015 (in Chinese)
- [24] 张建军, 唐轶君, 李晶, 李靖媛, 陈瑗, 崔学文. 基于测试片法与平板计数法对不同食品中菌落总数结果的比较分析[J]. *食品安全质量检测学报*, 2021, 12(14): 5606-5612
- Zhang JJ, Tang YJ, Li J, Li JY, Chen Y, Cui XW. Comparative analysis of the total number of colonies in different types of food based on the petrifilm aerobic count method and plate count method[J]. *Journal of Food Safety & Quality*, 2021, 12(14): 5606-5612 (in

- Chinese)
- [25] Bird P, Flannery J, Crowley E, Agin J, Goins D, Jechorek R. Evaluation of the 3M™ petrifilm™ rapid yeast and mold count plate for the enumeration of yeast and mold in food: collaborative study, first action 2014.05[J]. Journal of AOAC International, 2015, 98(3): 767-783
- [26] Temmerman R, Huys G, Swings J. Identification of lactic acid bacteria: culture-dependent and culture-independent methods[J]. Trends in Food Science & Technology, 2004, 15(7/8): 348-359
- [27] 叶桦秀, 李丽丽, 江莉莉. VITEK 2 Compact 微生物全自动分析系统的应用及鉴定结果分析[J]. 中国医疗器械信息, 2017, 23(24): 152-153, 156
Ye HX, Li LL, Jiang LL. Application and analysis of identification by VITEK 2 Compact automatic microbial analysis system[J]. China Medical Device Information, 2017, 23(24): 152-153, 156 (in Chinese)
- [28] 赵海红, 李存香, 李翔, 吴海生, 冯建萍, 金星, 祁芝珍, 张青雯. Biolog 微生物鉴定系统对鼠疫菌弱毒株及其噬菌体耐受株的鉴定比较研究[J]. 医学动物防制, 2019, 35(12): 1158-1162, 1237
Zhao HH, Li CX, Li X, Wu HS, Feng JP, Jin X, Qi ZZ, Zhang QW. A comparative study on the identification of attenuated strains of *Yersinia pestis* and their bacteriophage resistant strains by Biolog microbial identification system[J]. Journal of Medical Pest Control, 2019, 35(12): 1158-1162, 1237 (in Chinese)
- [29] Naumann D, Helm D, Labischinski H. Microbiological characterizations by FT-IR spectroscopy[J]. Nature, 1991, 351(6321): 81-82
- [30] 王静. 基于傅里叶变换红外光谱和化学计量技术的致病微生物鉴别系统研究[D]. 济南: 山东大学硕士学位论文, 2012
Wang J. Research on differentiation and identification systems of pathogens by FT-IR combined with chemometrics methods[D]. Jinan: Master's Thesis of Shandong University, 2012 (in Chinese)
- [31] Quéro L, Girard V, Pawtowski A, Tréguer S, Weill A, Arend S, Cellière B, Polsinelli S, Monnin V, Van Belkum A, et al. Development and application of MALDI-TOF MS for identification of food spoilage fungi[J]. Food Microbiology, 2019, 81: 76-88
- [32] Garrigos T, Neuwirth C, Chapuis A, Bador J, Amoureux L, Andre E, Barbier E, Caillon E, Cardor-Martin E, Cattoir V, et al. Development of a database for the rapid and accurate routine identification of *Achromobacter* species by matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS)[J]. Clinical Microbiology and Infection, 2021, 27(1): 126.e1-126.e5
- [33] 甘永琦, 农浚, 樊兰艳, 零文超, 朱斌, 张涛. 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
Gan YQ, Nong J, Fan LY, Ling WC, Zhu B, Zhang T. Analysis of microbial community of heat resistant microorganisms in Chinese herbal pieces[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2018, 43(11): 2274-2281 (in Chinese)
- [34] 张伟铮, 关文苑, 李松, 赵婵静, 邓光远, 陈茶. ITS 序列分析与 MALDI-TOF MS 质谱技术在丝状真菌鉴定中的应用[J]. 菌物学报, 2019, 38(8): 1298-1305
Zhang WZ, Guan WY, Li S, Zhao CJ, Deng GY, Chen C. ITS sequence analyses and MALDI-TOF MS in the identification of filamentous fungi[J]. Mycosystema, 2019, 38(8): 1298-1305 (in Chinese)
- [35] 李艳君, 孙钊坤, 丁赔赔, 王姣贤, 董蓉, 赵强元. 自建 MALDI-TOF MS 霉菌数据库的研究[J]. 国际检验医学杂志, 2021, 42(6): 645-648, 652
Li YJ, Sun ZK, Ding PP, Wang JX, Dong R, Zhao QY. Study of the in-house mold database of MALDI-TOF MS[J]. International Journal of Laboratory Medicine, 2021, 42(6): 645-648, 652 (in Chinese)
- [36] Chung CR, Wang HY, Lien F, Tseng YJ, Chen CH, Lee TY, Liu TP, Horng JT, Lu JJ. Incorporating statistical test and machine intelligence into strain typing of *Staphylococcus haemolyticus* based on matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry[J]. Frontiers in Microbiology, 2019, 10: 2120
- [37] 梁子英, 刘芳. 实时荧光定量 PCR 技术及其应用研究进展[J]. 现代农业科技, 2020(6): 1-3, 8
Liang ZY, Liu F. Research progress on real-time quantitative PCR technology and its application[J]. Modern Agricultural Science and Technology, 2020(6): 1-3, 8 (in Chinese)
- [38] Lei SW, Chen S, Zhong QP. Digital PCR for accurate quantification of pathogens: principles, applications, challenges and future prospects[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2021, 184: 750-759
- [39] 费鹏, 杨同香, 姜亦超, 陈俊亮, 罗磊, 任广跃, 康怀彬, Forsythe S. 克罗诺杆菌分型技术研究进展[J]. 食品科学, 2017, 38(21): 308-312
Fei P, Yang TX, Jiang YC, Chen JL, Luo L, Ren GY,

- Kang HB, Forsythe S. Progress in typing methods for *Cronobacter* spp.[J]. Food Science, 2017, 38(21): 308-312 (in Chinese)
- [40] 宋明辉, 李琼琼, 冯震, 范一灵, 刘浩, 杨美成. 葡萄球菌属不同靶基因序列种水平鉴定能力的比较评价研究[J]. 药物分析杂志, 2018, 38(4): 672-679
Song MH, Li QQ, Feng Z, Fan YL, Liu H, Yang MC. Evaluation on molecular identification capacity of different target gene sequences for *Staphylococcus* species[J]. Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis, 2018, 38(4): 672-679 (in Chinese)
- [41] 尚玉婷. 沙门氏菌全基因组数据库构建及其分子靶标挖掘与应用研究[D]. 无锡: 江南大学博士学位论文, 2021
Shang YT. Construction of *Salmonella* whole genome database and its molecular targets mining and application research[D]. Wuxi: Doctoral Dissertation of Jiangnan University, 2021 (in Chinese)
- [42] Su XJ, Luo ZL, Jeewon R, Bhat DJ, Bao DF, Li WL, Hao Y, Su HY, Hyde KD. Morphology and multigene phylogeny reveal new genus and species of *Torulaceae* from freshwater habitats in northwestern Yunnan, China[J]. Mycological Progress, 2018, 17(5): 531-545
- [43] Frisvad JC, Hubka V, Ezekiel CN, Hong SB, Nováková A, Chen AJ, Arzanlou M, Larsen TO, Sklenář F, Mahakarnchanakul W, et al. Taxonomy of *Aspergillus* section Flavi and their production of aflatoxins, ochratoxins and other mycotoxins[J]. Studies in Mycology, 2019, 93: 1-63
- [44] Wang XC, Chen K, Zeng ZQ, Zhuang WY. Phylogeny and morphological analyses of *Penicillium* section sclerotiora (Fungi) lead to the discovery of five new species[J]. Scientific Reports, 2017, 7: 8233
- [45] 李琼琼, 范一灵, 宋明辉, 秦峰, 杨美成. 基于高通量测序的 6 类中药饮片污染微生物群落特征分析[J]. 药物分析杂志, 2019, 39(11): 1945-1953
Li QQ, Fan YL, Song MH, Qin F, Yang MC. Microbial community composition analysis of six Chinese herbal pieces through 16S rRNA high-throughput sequencing[J]. Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis, 2019, 39(11): 1945-1953 (in Chinese)
- [46] 李婷, 姜丹, 胡小松, 常晓茜, 许贞, 巩颖, 华国栋, 刘春生. 基于高通量测序技术对市售柏子仁表面真菌多样性的研究 [J]. 药学学报, 2019, 54(11): 2100-2105
Li T, Jiang D, Hu XS, Chang XX, Xu Z, Gong Y, Hua GD, Liu CS. Study on the surface fungus diversity of commercially *Playcladi semen* based on high-throughput sequencing technology[J]. Acta Pharmaceutica Sinica, 2019, 54(11): 2100-2105 (in Chinese)