

中药饮片微生物污染现状及典型菌鉴定研究进展

邓海英¹, 龚勇祥¹, 李连凤¹, 邓雪丹¹, 唐 诗¹, 康四和², 江珍玉^{1*}

1. 武汉科技大学医学院, 职业危害识别与控制湖北省重点实验室, 湖北 武汉 430065

2. 湖北省药品监督检验研究院, 湖北 武汉 430075

摘 要: 微生物污染是饮片外源性污染的主要形式之一, 也是影响人体健康的重要途径。对近 10 年来饮片微生物污染及典型菌研究进展进行综述, 结果显示目前我国饮片微生物污染较为严重, 不同品种、来源及炮制方法饮片间微生物污染存在较大差异, 耐热菌及耐胆盐革兰阴性菌污染率高, 其他控制菌检出率较低。污染典型菌的分离鉴定研究主要集中于耐热菌及革兰阴性杆菌, 典型耐热菌主要是来源于土壤及其他外环境的芽胞杆菌属, 少数分离菌株对人类有致病报道; 分离的典型革兰阴性杆菌 70%以上菌株有致病报道, 以阴沟肠杆菌为常见分离菌。近年来, 一些新的污染典型菌检测方法逐步被应用, 如 API、Vitek2 Compact 鉴定系统、FRIT、MALDI-TOF/MS、核糖体分型技术及 16 S rRNA 宏基因组高通量测序技术等, 这些方法较传统方法更灵敏、快捷和准确。

关键词: 饮片; 微生物污染; 典型菌; 耐热菌; 革兰阴性杆菌

中图分类号: R291.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2019)09-2242-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.09.034

Research progress on microbial contamination of decoction pieces and identification of typical bacteria

DENG Hai-ying¹, GONG Yong-xiang¹, LI Lian-feng¹, DENG Xue-dan¹, TANG Shi¹, KANG Si-he²,
JIANG Zhen-yu¹

1. Medical College of Wuhan University of Science and Technology, Hubei Province Key Laboratory of Occupational Hazard Identification and Control, Wuhan 430065, China

2. Hubei Institute for Drug Control, Wuhan 430075, China

Abstract: Microbial contamination is one of exogenous contamination of decoction pieces and is also an important way to affect human health. In this paper, to explore the research progress on microbiological contamination and typical bacteria in decoction pieces, the literatures on microbial pollution of decoction pieces in recent 10 years were reviewed. The results showed that the microbiological contamination in decoction pieces in China was serious, the microbial contamination of decoction pieces among different varieties, sources, and processing methods showed significant differences. The detection rates of heat-resistant bacteria and bile-tolerant gram-negative bacteria were high, while that of other control bacteria was low. The research of typical bacteria in decoction pieces mainly focused on the heat-resistant bacteria and gram-negative bacilli. The isolated heat-resistant bacteria were mainly derived from bacillus in the soil or other external environments, and few isolated strains were reported to cause disease in human. More than 70% of gram-negative bacilli isolated from decoction pieces were reported to be pathogenic, and *Enterobacter cloacae* was more common than other isolated gram-negative bacilli. In addition to conventional methods, more sensitive, fast, and accurate methods have been adopted for the identification of typical bacteria contaminated in decoction pieces, such as API, Vitek2 Compact identification system, FRIT, MALDI-TOF/MS, ribotyping, and 16 S rRNA high-throughput sequencing.

Key words: decoction pieces; microbe contamination; typical bacterium; heat-resistant bacteria; gram-negative bacillus

中药饮片为一种特殊的药物类型,可直接口服, 污染的主要来源之一, 是影响中药饮片质量安全的
或经组方后用于制剂。微生物污染作为饮片外源性 重要因素, 备受国内外关注。目前, 关于中药或植

收稿日期: 2019-02-11

基金项目: 武汉科技大学大学生科技创新基金项目(17ZRA072)

作者简介: 邓海英(1972—), 女, 博士, 主要从事中药质量评价研究。E-mail: denghaiying@wust.edu.cn

*通信作者 江珍玉 Tel: 18086638839 E-mail: jiangzhenyu@wust.edu.cn

物药微生物控制研究主要包括 2 个方面：一是以样品中需氧菌总数和酵母真菌总数为指标进行检测，评价样品微生物总体污染程度；二是对样品中耐胆盐革兰阴性菌、沙门菌、大肠埃希菌、铜绿假单胞菌及白色念珠菌等规定控制菌进行检测，控制外源性致病因素带入。中药饮片来源广泛，不同品种受产地分布、土壤环境、炮制方法、加工水平、化学成分、储藏运输及使用等因素的影响，其微生物污染的类别及水平存在较大差异。我国由于受各地饮片生产条件限制，《中国药典》2015 年版仅规定了饮片耐胆盐革兰阴性菌限度标准及 10 g 样品中不得检出沙门菌。但饮片中微生物污染已成为普遍现象，尤其是控制菌污染及特定种类微生物的检出，导致饮片存在较高安全风险，严重影响了中药饮片作为药物属性的质量与安全，使得有效开展饮片微生物控制成为一项紧迫任务。本文对近年来我国中药饮片微生物污染总体情况、控制菌污染状况、典型菌污染及鉴定方法进行综述，为科学合理制定、完善饮片微生物标准提供依据。

1 饮片微生物污染状况

为评价外源微生物对饮片质量安全的影响，近年来学者对饮片微生物污染情况开展了大量研究工作。本文对近 10 年研究文献进行统计，共有 93 个品种约 1 500 批次饮片样品被研究，根据药用部位划分，样品中包括根及根茎类品种 33 个，果实或种子类品种 23 个，花类及全草类品种各 7 个，再依次为矿物类、茎木类、树脂与加工类、皮类、动物类及叶类等，各类研究品种统计结果见图 1。黄芪在所有品种中研究频次最高，达 6 次，其次为麦冬、白术、薏苡仁等，研究频次分别为 5、4、4 次。从

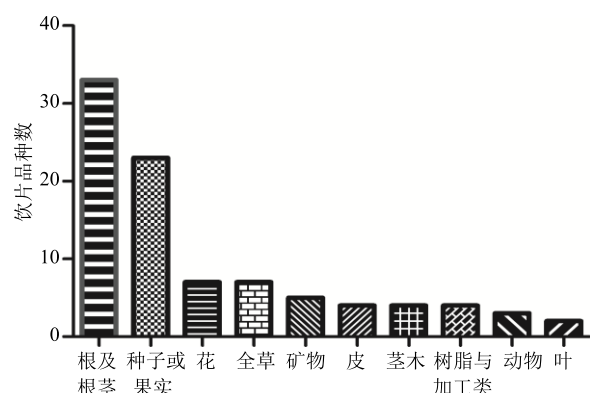


图 1 不同来源饮片微生物污染研究品种统计

Fig. 1 Summary of decoction pieces studied about microbial contamination

研究批次上看，瓜蒌研究批次达 81 批，其次为牛膝、通草、黄芪，分别为 72、64、60 批。

1.1 需氧菌总数 (TAMC) 及酵母真菌总数 (TYMC)

《中国药典》2015 年版主要以检测样品中 TAMC 及 TYMC 为指标对饮片微生物总体污染状况进行评价。根据研究情况，我国饮片微生物总体污染水平较高，不同品种间微生物污染存在较大差异，范一灵等^[1]对 10 种 94 批饮片的研究结果显示，样品的 TAMC 介于 $10 \sim 1 \times 10^8$ CFU/g，TYMC 介于 $10 \sim 1 \times 10^7$ CFU/g，连翘和山慈菇的 TAMC 高于其他饮片。刘洪祥等^[2]对艾叶等 10 种 100 批饮片的研究结果显示，艾叶、甘松、枸杞和酒黄精的 lgTAMC、lgTYMC 值高于黄芪、牡丹皮、薏苡仁、泽泻、制何首乌和煅牡蛎。张光华等^[3]对地黄等 10 种 100 批饮片的研究结果显示，样品的 lgTAMC 值为 2.0~6.8，lgTYMC 值为 1.0~6.0。本课题组对黄芪等 5 种 35 批饮片的研究显示^[4]，分别有 25.7% (9/35) 样品的 TAMC、TYMC 检测结果超过《美国药典》(USP38) 限度规定，黄芪、甘草 TAMC、TYMC 高于丹参、麦冬及天冬，样品 TAMC 与 TYMC、耐胆盐革兰阴性菌载量相关。经聚类分析显示黄芪、甘草聚于 A 分支，为微生物高污染型，天冬、麦冬及丹参聚于 B 分支，属微生物低污染型。受生长条件及加工方式的不同，饮片污染情况也存在差异，吴鑫^[5]对来源于 5 种不同使用部位的 10 种 100 批饮片微生物污染研究结果显示，茎类样品 TAMC 污染水平高于根类及果实，果实类样品的 TYMC 污染水平最高，炮炙饮片与切碎样品间 TYMC 结果显示有统计学差异。刘鹏等^[6]对 35 种 105 批饮片的研究结果显示，炮制后中药饮片的染菌数少于未经炮制的中药饮片，其污染程度依次为米炒>法制>炙法>清炒>酒炙>醋制>姜制>焦法。

1.2 耐热菌污染情况

除直接口服饮片外，多数饮片经加热处理后细菌载量会大幅降低，但部分耐热菌仍可残存于样品中，杨晓莉等^[7]研究结果显示，经热处理后，中药饮片耐热菌总数较 TAMC 平均下降 2.6 个对数单位，但耐热菌数>10 CFU/g 者达 80.84% (97/120)。另有研究^[8]表明，芫花经 120 min 沸水浴处理后仍含有较高数量的耐热菌，且经 48 h 冷藏储存后，耐热菌数量明显增加，提示加强耐热菌控制的必要性。耐热菌定量检测方法是将样品沸水浴 30 min 后检

测可生长的需氧菌及兼性厌氧菌载量。张光华等^[3]对北京地区销售的地黄等 10 种 100 批饮片进行研究,发现耐热菌污染检出率达 100%。刘广桢等^[9]研究结果显示,81 批瓜蒌的耐热菌污染率高达 91%。刘鹏等^[10]对 55 批红花检测结果显示,44 批样品中有耐热菌检出。研究表明,上述饮片中耐热菌污染较为严重。本课题组对 5 种根类饮片 35 批样品检测结果显示,42.9% (15/35) 的样品可检出耐热菌,其中黄芪耐热菌检出率最低,为 20%,而天冬检出率最高,达 80%^[11]。耐热菌主要来源于药材种植的土壤环境,土壤环境的背景耐热菌及药材土壤残留与耐热菌检出率有密切关系。由于不同种类饮片污染情况较为复杂,《中国药典》2015 年版并未规定耐热菌载量限度值,故其安全风险仍然存在,开展饮片耐热菌安全性评价是科学制定耐热菌载量限度范围的基础,仍需深入开展大量研究工作。

1.3 控制菌污染情况

中药饮片控制菌主要包括耐胆盐革兰阴性菌、沙门菌 *Salmonella* spp.、大肠埃希菌 *Escherichia coli*、金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus*、铜绿假单胞菌 *Pseudomonas aeruginosa* 及白色念珠菌 *Candida albicans* 等有致病风险的微生物种类。根据《中国药典》2015 年版规定,中药饮片需对微生物进行控制并对控制菌的量及种类进行检测。大量文献显示,对饮片中耐胆盐革兰阴性菌、沙门菌、大肠埃希菌等控制菌的检测方式包括定量评价和定性检测。

1.3.1 定量评价 耐胆盐革兰阴性菌属于一类能耐受胆盐生长的革兰阴性菌,包括部分肠道致病菌或条件致病菌,是饮片中危害较高的微生物。对饮片控制菌的定量评价主要是对耐胆盐革兰阴性菌进行定量检测,《中国药典》2015 年版规定耐胆盐革兰阴性菌检出量不得超过 1×10^4 CFU/g。按药典规定 MPN 法检测,周爽等^[12]对 17 个品种 174 批中药饮片耐胆盐革兰阴性菌检测,显示样品污染率达 81.0%。对 81 批瓜蒌的检测结果显示,样品中耐胆盐革兰阴性菌污染率达 91%。本课题组对不同品种耐胆盐革兰阴性菌污染进行检测,结果显示 45% (18/40) 的样品检出耐胆盐革兰阴性菌污染,黄芪等 7 批样品检测结果 $N > 1\ 000$ MPN/g^[11]。上述结果提示,我国饮片的耐胆盐革兰阴性菌检出率均较高。耐胆盐革兰阴性菌主要是药材种植过程中因施加粪肥造成的微生物污染,可通过净制清洗等手段

降低或消除,我国中药饮片中大量存在耐胆盐革兰阴性菌污染超标,反映出从业人员对饮片作为药物属性的认知水平较低,饮片加工过程中普遍存在净制清洗不彻底,同时对饮片的科学灭菌措施探索不够,其加工过程亟待加强及精细化。

1.3.2 定性检测 主要是对沙门菌、大肠埃希菌等其他控制菌进行定性检测。对近年来文献研究进行统计,我国中药饮片的定性控制菌整体检出率较低。在上海地区 10 种 94 批饮片样品中,有 1 批山慈菇检出大肠埃希菌^[1]。对陕西省 12 种 120 批饮片微生物污染的研究结果^[13]显示,大肠埃希菌的检出率为 3.33%,铜绿假单胞菌的检出率为 7.5%。饮片中检出种类最多的细菌为大肠埃希菌,在通草、鱼腥草等 16 个品种中有检出。其次为铜绿假单胞菌,在通草、天冬等 12 个品种中检出,另外在麦冬、麸炒苍术、甘松、红花 4 个品种中报道有检出伤寒沙门菌,甘草、艾叶、甘松 3 个品种中检出金黄色葡萄球菌,两头尖中有检出志贺菌报道,未见溶血性链球菌、白色念珠菌检出的报道。污染菌检出类型较多的品种分别是甘松、艾叶。不同种类控制菌在饮片中的检出情况见表 1。

2 典型污染菌鉴定研究

饮片中污染特定微生物或其产生的毒素及菌体成分残留,可对饮片质量安全造成潜在风险。为探讨饮片中该类型微生物污染类群及潜在危害,学者对饮片中典型污染菌进行了分离、鉴定。

2.1 典型耐热菌

中药饮片除部分直接服用或以粉末入丸、散等外,很大部分为水煮煎服或泡服使用,刘鹏等^[10]将来源于红花的耐热菌置沸水浴 90 min 后划线于胰酪大豆胨琼脂平板,仍有 32% 的菌株可以生长。为探讨耐热菌的组成群落及潜在的风险,学者们对多个饮片品种的耐热菌进行了分离鉴定研究,鉴定结果见表 2。研究结果显示,所分离菌株主要是来源于土壤及其他外环境等的芽胞杆菌属细菌,其中 10 株菌有对人致病的报道。黄芪、通草、小通草耐热菌污染情况最为复杂,可分离菌株类型超过 7 种,麦冬、芫花、芥子、自然铜、鸦胆子、瓜蒌、牛膝分离菌株超过 3 种,其余大部分被检饮片可分离到 1~2 种芽胞杆菌。研究饮片中分离到的最常见耐热菌株是枯草芽胞杆菌,共涉及麦冬、合欢皮等 17 个品种;其次为地衣芽胞杆菌,涉及到黄柏等 9 个品种;解淀粉芽胞杆菌可在麦冬等 8 个品种中分离到。

表 1 饮片控制菌污染情况

Table 1 Control of bacteria contamination of decoction pieces

分离菌株	品种数	饮片品种
大肠埃希菌	16	通草 ^[14] 、鱼腥草 ^[15] 、丹参 ^[11] 、天冬 ^[4] 、黄芪 ^[4] 、炒芥子 ^[5] 、山慈菇 ^[1] 、艾叶 ^[16] 、甘松 ^[16] 、枸杞 ^[16] 、金银花 ^[13] 、合欢皮 ^[13] 、重楼 ^[13] 、穿心莲 ^[13] 、桑寄生 ^[17] 、两头尖 ^[17]
铜绿假单胞菌	12	通草 ^[14] 、天冬 ^[4] 、炒芥子 ^[5] 、艾叶 ^[16] 、甘松 ^[16] 、海螵蛸 ^[13] 、姜黄 ^[13] 、百合 ^[13] 、白术 ^[13] 、穿心莲 ^[13] 、鸦胆子 ^[13] 、龙骨 ^[13]
沙门菌	4	麦冬 ^[5] 、麸炒苍术 ^[5] 、甘松 ^[16] 、红花 ^[10]
金黄色葡萄球菌	3	甘草 ^[4] 、艾叶 ^[16] 、甘松 ^[16]
志贺菌 <i>Shigella</i>	1	两头尖 ^[17]

2.2 典型革兰阴性杆菌

近年来,学者们对紫红胆盐葡萄糖琼脂平板、麦康凯琼脂平板等选择培养基上分离到的饮片典型污染菌株进行了鉴定分类,谢文明等^[17]在两头尖的多个样品中分离得到了阴沟肠杆菌 *Enterobacter cloacae*、肺炎克雷伯菌肺炎亚种 *Klebsiella pneumoniae* ssp. *pneumoniae*、非脱羧勒克菌 *Leclercia adecarboxylata*、缓慢葡萄球菌 *S. lentus*、泛菌属 *Pantoea* 和阪崎新生儿感染杆菌群 *Cronbacter sakazakii* group。甘永琦等^[14]从通草样品中分离到的主要典型菌为肺炎克雷伯菌、阴沟肠杆菌、阪崎克罗诺杆菌 *C. sakazakii*。提示饮片中分离的典型污染菌主要以革兰阴性杆菌为主,尤其是肠杆菌科细菌。为探讨饮片中典型污染菌导致感染的风险,本文对近年来文献在中药饮片样品中分离到的典型革兰阴性杆菌进行统计,结果显示,共有 17 种典型革兰阴性杆菌被检出,这些菌株主要来源于人与其他动物的肠道或其他腔道,与药材种植过程中粪肥使用有密切关系,少量来源于外环境,样品与检出菌株信息见表 3。与表 2 中结果比较,有 76.5% (13/17) 的菌株已有感染病例报道。其中,阴沟肠杆菌是样品中分离到最常见的菌株,涉及通草、枸杞子等 18 个品种;其次为肺炎克雷伯菌肺炎亚种,共在枸杞子、合欢皮等 9 个品种分离到。而产气肠杆菌、泛菌属、非脱羧勒克菌及阪崎肠杆菌均有从 5 个左右饮片品种中分离到。

3 饮片污染菌检测新方法研究

目前,我国饮片生产单位及检验机构对饮片典型污染菌的鉴定主要依据药典规定流程方法先分离可疑菌株,进一步采用传统细菌表型方法进行鉴定。近年来,一些新检测方法逐渐被应用于饮片中污染菌的检测与鉴定。

3.1 基于细菌形态生理生化反应特征的鉴定方法

API 鉴定系统、Vitek2 Compact 鉴定系统是根据微生物的生理、生化特征结果进行数值分类鉴定,目前已被应用并逐渐取代纯手工表型鉴定方法,API 鉴定系统为手工操作系统,通过人工判读试剂条上颜色、浊度的变化记录生化反应结果^[47]。Vitek 系统为集成化的全自动微生物鉴定系统,生化反应种类更多,仪器通过自动判读测定卡片内各孔培养基的生长变化值,以生长动力学方式记录并判定结果,不仅省时,且减少了人为因素的影响^[48],在饮片控制菌鉴定中的应用越来越广泛。江志杰等^[33]运用 Vitek2 Compact 系统对鳖甲中典型污染菌进行鉴定及耐药性分析,结果显示共分离污染菌 68 株,其中革兰阳性菌 29 株,革兰阴性菌 23 株,菌种鉴定样品中存在阪崎肠杆菌、阴沟肠杆菌等致病菌或条件致病菌,所分离的 23 株革兰阴性杆菌对氨苄西林、头孢唑林、氨苄西林/舒巴坦和头孢替坦耐药率比较高。林铁豪等^[15]对 10 批鱼腥草污染菌运用 Vitek2 Compact 鉴定系统鉴定,结果显示 1 批样品中存在产气肠杆菌,2 批样品中存在阴沟肠杆菌污染。杨燕等^[49]对 API、Vitek2 Compact 鉴定系统等常见药品微生物快速鉴定技术的方法学进行一致性评价,结果显示 API、Vitek2 Compact 鉴定系统均可用于药品控制菌鉴定,但在非控制菌检验上存在差异,在种、属水平的鉴定结果中,API 对枯草芽胞杆菌的鉴定重现性较差,对肺炎克雷伯菌、啤酒酵母菌 *Saccharomyces cerevisiae* 的鉴定准确性和重复性均较差;Vitek 对枯草芽胞杆菌的鉴定重现性较差,需结合其他方法进行补充鉴定。

3.2 基于微生物所含化学成分或代谢产物的检测方法

3.2.1 傅里叶红外光谱 (fourier translation infrared

表2 饮片耐热菌株分离鉴定情况

Table 2 Isolation and identification of heat-resistant bacteria strains in decoction pieces

分离菌株	来源	致病性	饮片 品种数	饮片品种
枯草芽胞杆菌 <i>Bacillus subtilis</i>	土壤、湖泊、海洋、 动植物体表	未见报道	17	麦冬 ^[5] 、合欢皮 ^[5] 、桃仁 ^[5] 、芥子 ^[5] 、自然铜 ^[1] 、芫花 ^[5,8] 、鸦胆子 ^[7] 、红花 ^[10] 、黄芪 ^[18] 、白芍 ^[18] 、广山药 ^[18] 、南五味子 ^[18] 、熟地黄 ^[18] 、牛膝 ^[18] 、通草 ^[18] 、小通草 ^[18] 、牛膝 ^[18]
地衣芽胞杆菌 <i>B. licheniformis</i>	土壤及植物微生态	对鸡有致病性 ^[19]	9	黄柏 ^[5] 、女贞子 ^[5] 、海螵蛸 ^[7] 、牡蛎 ^[7] 、瓜蒌 ^[9] 、黄芪 ^[18] 、牛膝 ^[18] 、通草 ^[18] 、小通草 ^[18]
解淀粉芽胞杆菌 <i>B. amyloliquefaciens</i>	土壤、植物微生态 系统	未见报道	8	麦冬 ^[5] 、芥子 ^[5] 、自然铜 ^[5] 、芫花 ^[5,8] 、鸦胆子 ^[7] 、黄芪 ^[18] 、牛膝 ^[18] 、小通草 ^[18]
迟缓芽胞杆菌 <i>B. lentus</i>	未见报道	未见报道	5	芥子 ^[5] 、自然铜 ^[5] 、芫花 ^[5] 、瓜蒌 ^[9] 、小通草 ^[18]
巨大芽胞杆菌 <i>B. megaterium</i>	土壤、海水、植物 微生态系统	未见报道	4	瓜蒌 ^[9] 、白芍 ^[18] 、通草 ^[18] 、小通草 ^[18]
莫氏芽胞杆菌 <i>B. mojavensis</i>	土壤、海水、植物 微生态系统	未见报道	3	黄芪 ^[18] 、通草 ^[18] 、小通草 ^[18]
少动鞘氨醇杆菌 <i>Sphingomonas paucimobili</i>	医院环境	脓气胸、菌血症等 ^[20]	3	姜黄 ^[7] 、重楼 ^[7] 、龙骨 ^[7]
<i>B. oryzaecorticis</i>	谷壳或外环境	未见报道	3	黄芪 ^[18] 、牛膝 ^[18] 、通草 ^[18]
蜡样芽胞杆菌 <i>B. cereus</i>	土壤、灰尘、污水	食物中毒 ^[21]	2	通草 ^[18] 、小通草 ^[18]
特基拉芽胞杆菌 <i>B. tequila</i>	土壤	未见报道	2	广山药 ^[18] 、小通草 ^[18]
短芽胞杆菌 <i>Brevibacillus borstelensis</i>	土壤、水、空气	化脓性感染 ^[22]	2	黄芪 ^[18] 、小通草 ^[18]
死谷芽胞杆菌 <i>B. vallismortis</i>	土壤、水、动植物 表面	未见报道	2	炒苍术 ^[5] 、炒枳壳 ^[5]
缓慢葡萄球菌 <i>S. lentus</i>	外环境	人、小鼠、猪感染 ^[23]	2	鸦胆子 ^[7] 、牡蛎 ^[7]
萎缩芽胞杆菌 <i>B. atrophaeus</i>	土壤	未见报道	1	麦冬 ^[5]
阪崎肠杆菌 <i>E. sakazakii</i>	人与动物肠道	新生儿脑膜炎、菌血症等 ^[24]	1	龙骨 ^[7]
莫拉菌群 <i>Moraxella</i> spp.	人口咽部	龋病、呼吸道感染 ^[25]	1	鸦胆子 ^[7]
巴斯德菌属 <i>Pasteurella</i> spp.	脊椎动物呼吸道、 消化道黏膜	人畜共患病病原 ^[26]	1	鸦胆子 ^[7]
深褐芽胞杆菌 <i>B. brunensis</i>	植物表面	未见报道	1	鸦胆子 ^[7]
铅黄肠球菌 <i>E. casseliflavus</i>	人与动物胃肠道	尿路感染、胆道感染及其他 ^[27]	1	海螵蛸 ^[2]
放射根瘤菌 <i>Rhizobium radiobacter</i>	土壤	导管相关性血流感染、 尿路感染 ^[28]	1	穿心莲 ^[7]
泛菌属	湿地底泥	未见报道	1	合欢皮 ^[7]
凝结芽胞杆菌 <i>B. coagulans</i>	肠道	未见报道	1	瓜蒌 ^[7]
<i>B. simplex</i>	土壤及植物表面	未见报道	1	黄芪 ^[18]
<i>B. huizhouensis</i>	稻田土壤	未见报道	1	黄芪 ^[18]
<i>Paenibacillus woosongensis</i>	森林土壤	未见报道	1	黄芪 ^[18]
<i>Solibacillus silvestris</i>	活性污泥	未见报道	1	黄芪 ^[18]
黄原胶降解菌 <i>P. lautus</i>	植物生态系统	未见报道	1	白芍 ^[18]
环状芽胞杆菌 <i>B. circulans</i>	土壤、水、空气尘埃	化脓性感染 ^[29]	1	熟地黄 ^[18]
阿氏芽胞杆菌 <i>B. aryabhattai</i>	土壤、深海、动物 肠道、植物根际	未见报道	1	通草 ^[18]
<i>B. sonorensis</i>	土壤	未见报道	1	小通草 ^[18]

表 3 中药饮片典型革兰阴性杆菌污染情况
Table 3 Typical gram-negative bacilli contamination in decoction pieces

分离菌株	来源	致病性	饮片 品种数	饮片品种
阴沟肠杆菌	自然界普遍存在	条件致病菌, 呼吸系统、泌尿系统感染 ^[30]	18	通草 ^[14] 、枸杞子 ^[16,31] 、鱼腥草 ^[15] 、牡丹皮 ^[16] 、薏苡仁 ^[16] 、金银花 ^[13] 、合欢皮 ^[13] 、白术 ^[13] 、鸦胆子 ^[13] 、牡蛎 ^[13] 、姜黄 ^[13] 、丹参 ^[11] 、天冬 ^[11] 、白菊花 ^[32] 、杭菊 ^[32] 、菊花 ^[32] 、两头尖 ^[17] 、鳖甲 ^[33]
肺炎克雷伯菌肺炎亚种	人体口腔、皮肤肠道	肺、尿道、腹腔、手术部位及软组织感染等 ^[34]	9	枸杞子 ^[16,31] 、合欢皮 ^[13] 、夏枯草 ^[13] 、鸦胆子 ^[13] 、菊花 ^[32] 、浙贝 ^[32] 、两头尖 ^[17] 、桑寄生 ^[17] 、鳖甲 ^[33]
产气肠杆菌 <i>E. aerogenes</i>	外环境	医院感染 ^[35]	6	鱼腥草 ^[15] 、艾叶 ^[16] 、海螵蛸 ^[13] 、鸦胆子 ^[13] 、龙骨 ^[13] 、浙贝 ^[32]
泛菌属	土壤	未见报道	5	通草 ^[14] 、枸杞子 ^[31] 、艾叶 ^[16] 、薏苡仁 ^[16] 、两头尖 ^[17]
非脱羧勒克菌	人与动物肠道	免疫低下患者感染 ^[36]	5	通草 ^[14] 、盐补骨脂 ^[37] 、生石膏 ^[37] 、制吴茱萸 ^[37] 、两头尖 ^[17]
阪崎肠杆菌	人和动物肠道内寄生菌	A 类致病菌, 消化道感染 ^[38]	5	艾叶 ^[16] 、薏苡仁 ^[16] 、麦冬 ^[11] 、两头尖 ^[17] 、鳖甲 ^[33]
产酸克雷伯菌 <i>K. oxytoca</i>	人呼吸道与肠道	条件致病菌, 呼吸系统、泌尿系统感染 ^[39]	2	通草 ^[14] 、丹参 ^[11]
致伤埃希菌 <i>E. vulneris</i>	外环境	化脓性感染 ^[40]	2	通草 ^[14] 、当归 ^[11]
郝氏埃希菌 <i>E. hermannii</i>	人与动物肠道	条件性致病菌 ^[41]	2	牡蛎 ^[13] 、鳖甲 ^[33]
普利茅斯沙雷氏菌 <i>Plymouth serratia</i>	自然界	肺部感染、尿路感染、败血症 ^[42]	2	川芎 ^[11] 、党参 ^[11]
假单胞菌 <i>Pseudomonas</i>	土壤、水、空气	因鉴定种不同而异	1	夏枯草 ^[13]
奈特西地西菌 <i>Cedecea neteri</i>	呼吸道	呼吸系统感染 ^[43]	1	川芎 ^[11]
河生肠杆菌 <i>E. amnigenus</i>	土壤、水	条件致病菌, 化脓性感染 ^[44]	1	麦冬 ^[11]
格高菲肠杆菌 <i>E. gergoviae</i>	土壤、水	未见报道	1	天冬 ^[11]
假结核耶尔森菌 <i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	动物肠道	暴发性败血症、肠系膜淋巴结炎 ^[45]	1	党参 ^[11]
潘尼变形杆菌 <i>Prpteus penneri</i>	动物肠道	条件致病菌, 败血症、尿路感染、呼吸道感染 ^[46]	1	党参 ^[11]
泰勒奇肠杆菌 <i>E. taylori</i>	土壤、水	未见报道	1	党参 ^[11]

spectroscopy, FTIR) 分析法 FTIR 分析法是通过读取样品所含化学成分化学键的振动, 提供高度特异性全生物生化成分的光谱定量信息形成图谱, 样品的特征图谱反映该样品中核酸、蛋白质、碳水化合物的构成。Garon 等^[50]运用 FTIR 快速检测农业环境中的黄曲霉 *Aspergillus flavus*、烟曲霉 *A.*

fumigatus 及寄生曲霉 *A. parasitic*, 并分析了产黄曲菌, 但不能有效区分烟曲霉产毒株与非产毒株。Amiali 等^[51]采用主成分分析 (PCA)、自组织特征映射和 k 近邻算法对不同表型的凝固酶阴性葡萄球菌 coagulase negative *Staphylococcus* 的 FTIR 光谱相似性进行聚类, 对来自单个狭窄区域 (2 888~2 868

cm^{-1}) 的一阶导数归一化光谱数据进行 PCA, 结果显示凝固酶阴性菌株与甲氧西林敏感金黄色葡萄球菌 methicillin-sensitive *S. aureus* 及甲氧西林耐药金黄色葡萄球菌 methicillin-resistant *S. aureus* 可完全区分。FTIR 作为一种高通量、非破坏性检测方法, 逐渐应用于饮片微生物污染检测, 陈伟盛等^[52]将 FTIR 分析方法运用于饮片样品和环境来源菌株的鉴定分型及同源性研究, 待检菌株经分离纯化, 制备样品, 选择 $3\,705\sim 2\,785\text{ cm}^{-1}$ 及 $1\,745\sim 910\text{ cm}^{-1}$ 谱段获得图谱, 运用 OPUS-Lab 软件对图谱进行一阶导数与矢量归一化处理, 使用重现水平归一法进行聚类分析, 结果显示, 来源于样品中的 4 株菌与来源于环境中 1 株菌聚为 1 类, 经生化反应鉴定证实均为嗜麦芽寡养单胞菌 *Stenotrophomonas maltophilia*; 来源于环境中的 5 株菌聚为另一类, 均为微球菌 *Micrococcus*, 由于微球菌属内各种间细胞生化成分相似, 无法运用 FTIR 分析进一步区分藤黄微球菌 *M. luteus* 与莱拉微球菌 *M. lylae*。可见 FTIR 分析对于饮片样品污染的快速溯源具有一定优势。杨丽君等^[53]对 FTIR 用于细菌检测的影响因素进行了研究, FTIR 技术可以将不同浓度、不同培养时间、活体与加热灭活的大肠杆菌进行有效区分, 说明细菌浓度、培养时间及加热灭活会影响细菌的光谱特征并干扰 FTIR 的细菌检测结果。

3.2.2 基质辅助激光飞行质谱解吸/电离时间 (matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry, MALDI-TOF/MS) 测定法 MALDI-TOF/MS 测定法是检测细菌裂解物中丰度高而保守的核蛋白质谱信号, 将质谱信号与专用质谱库或公开的蛋白质组学/基因组学数据库中收集的参考菌株质谱进行比较, 通过与之匹配的相应菌株鉴定分值及排名进行细菌属、种或亚种的判定^[54]。MALDI-TOF/MS 方法已用于食品腐败真菌^[55]、厌氧菌^[56]及水环境病原菌^[57]的鉴定。国内也有学者将 MALDI-TOF/MS 法应用于中药材的微生物污染评价, 甘永琦等^[14]在研究通草饮片微生物污染中, 采用 MALDI-TOF/MS 对紫红胆盐葡萄糖琼脂平板、麦康凯琼脂平板和木糖赖氨酸脱氧胆酸盐琼脂平板上生长的可疑菌及在胰酪大豆胨琼脂平板上生长的耐热菌株进行了快速初筛, 所得结果经全自动微生物鉴定及药敏分析系统证实。为探讨污染中药饮片的耐热菌微生物组成和多样性特征, 甘永琦等^[18]运用 MALDI-TOF/MS 分析方法在黄芪等 7 个品种 40

批样品中检出耐热菌, 鉴定菌株 23 种, 分别归属于 4 个属 (*Bacillus*、*Brevibacillus*、*Paenibacillus*、*Solibacillus*), 检出率最高品种为小通草, 其次为通草, 检出率最低的为南五味子和鸡血藤, 检出率较高的菌株为枯草芽胞杆菌。MALDI-TOF/MS 在菌株分离完成后几分钟即能出结果, 耗时短, 降低了样品被污染的风险, 且具有较好的稳定性和可重复性, 在灵敏度和准确性总体表现方面优于传统的细菌生化鉴定方法。

3.3 基于细菌遗传物质的分析方法

3.3.1 核糖体分型技术 核糖体分型技术是将提取的细菌染色体 DNA 经限制性内切酶 (如 *EcoRI*) 切成小片段, 将经琼脂糖凝胶电泳分离出的片段转印至尼龙或硝化纤维素膜上, 运用标记的 23 S、16 S 和 5 S rRNA 序列探针进行杂交检测后, 获得由不同数目及分子量大小的片段构成的指纹图谱, 最后运用 BioNumerics 数据库软件识别带型, 并与特定菌株的图谱比对判断结果^[58]。目前, RiboPrinter 全自动微生物基因指纹鉴定系统已取代手工操作, 使操作更简便, 结果具有更好的重复性。该方法也逐渐应用于药材中微生物的检测, 刘鹏等^[10]运用杜邦全自动微生物基因指纹系统对红花中污染耐热菌进行分析, 结果显示 44 批样品均为枯草芽胞杆菌污染, 本法灵敏度高, 但时效性一般, 且待检菌需先分离纯化后才能检测, 故样品制备过程中需避免杂菌污染。

3.3.2 16 S rRNA 宏基因组高通量测序技术 基于 16S rDNA 扩增子的高通量测序技术是一种不需要进行细菌培养即可深入研究细菌群落与多样性的方法, 整个分析流程包括样品 DNA 提取, 基于 16 S rRNA 基因 V4~V5 区域的 PCR 扩增, 文库制备、测序、数据筛选, OTUs (operational taxonomic units) 及种的注释^[59]。甘永琦等^[18]在探讨饮片污染耐热菌群落及多样性研究中, 采用 Illumina Miseq 的 16 S rRNA 宏基因组高通量测序技术对 9 种饮片进行分析, 结果显示污染菌主要由厚壁菌门 (Firmicutes)、蓝菌门 (Cyanobacteria)、变形菌门 (Proteobacteria) 等组成, 其中厚壁菌门比例最大; 在科水平上的优势菌, 主要为芽胞杆菌科 (Bacillaceae)、类芽胞杆菌科 (Paenibacillaceae) 等 9 科, 其中芽胞杆菌科比例最大。各组优势菌属主要为芽胞杆菌属 *Bacillus*、短小芽胞杆菌属 *Brevibacillus* 和类芽胞杆菌属 *Paenibacillus*, 不同品种中还包括有土壤芽胞杆菌属 *Solibacillus*、甲基杆菌属 *Methylobacterium*、

短波单胞菌属 *Brevundimonas*、泛菌属 *Pantoea*、肠杆菌属 *Enterobacter* 等。本法可在不分离可疑菌的基础上直接提取样品中细菌 DNA, 快速高通量获取饮片污染菌的群落构成, 探寻可能潜在的致病菌, 且对检测相对丰度偏低、用传统培养方法不能分离鉴定的其他菌属存在优势。但由于测序长度有限, 会导致鉴定到种水平的结果不准确, 通常只分析属水平的测序结果。

4 结语

中药饮片作为一种特殊商品, 其质量安全长期以来是人们关注的焦点, 微生物污染是饮片外源性污染的主要形式之一, 也是影响人体健康的重要途径。我国饮片来源广泛, 种类繁多, 为保障饮片质量及人民用药安全, 加强饮片微生物污染控制迫在眉睫。

本文对近 10 年来饮片微生物污染研究文献进行了总结, 目前我国饮片总体微生物污染较为严重, 尤其是耐热菌和耐胆盐革兰阴性菌检出率较高, 这与药材种植土壤环境及粪肥使用等因素密切相关, 也反映出我国对饮片作为药物属性的认知水平较低, 饮片加工过程中普遍存在净制清洗不彻底等问题。为保证饮片质量安全, 必须加强药材规范化种植, 探索科学的饮片灭菌措施, 开展饮片加工过程规范化及精细化控制。开展饮片典型污染菌的分离鉴定, 有助于深入了解微生物污染类群及潜在危害, 根据研究报道, 饮片耐热菌主要来源于芽胞杆菌属, 少数分离菌株对人类有致病性, 而饮片中分离的典型革兰阴性杆菌 70% 以上菌株有致病性, 其中以阴沟肠杆菌为常见分离菌, 但对分离菌株的危害性研究尚不足。饮片污染菌检测方法除传统检测方法外, API 鉴定系统、Vitek2 Compact 鉴定系统、FRIT、MALDI-TOF/MS、核糖体分型技术及 16 S rRNA 宏基因组高通量测序技术逐步被应用, 上述检测方法各有优缺点, 在实际工作中应根据需要合理选择。

本文对我国中药饮片微生物污染状况进行了综述, 对典型菌的分离鉴定研究进行了分析, 为中药饮片质量评价及建立科学的中药饮片微生物控制标准提供了参考。但由于该项工作起步较晚, 研究饮片种类及数量仍不足, 需扩大研究范围, 积累更多数据。

参考文献

[1] 范一灵, 李琼琼, 房蕊, 等. 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.

[2] 刘洪祥, 曹晓云. 中药饮片中需氧菌、霉菌和酵母菌污染情况的研究及分析 [J]. 天津药学, 2017, 29(1): 9-14.

[3] 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.

[4] 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): 1594-1598.

[5] 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.

[6] 刘鹏, 许华玉, 特玉香, 等. 中药饮片微生物限度的考察与思考 [J]. 中国中药杂志, 2002, 27(8): 628-629.

[7] 杨晓莉, 李辉, 绳金房. 12 种中药饮片耐热菌污染状况调查及风险评估 [J]. 陕西中医, 2016, 37(6): 740-743.

[8] 李珏, 郑小玲, 梁法勇, 等. 中药饮片麦冬和芫花中耐热菌的考察 [J]. 中国现代应用药学, 2016, 33(5): 642-644.

[9] 刘广植, 林永强, 林林, 等. 部分地区瓜蒌饮片的微生物污染状况分析 [J]. 中国药理学杂志, 2016, 51(22): 1962-1966.

[10] 刘鹏, 战宏利, 杨美琴, 等. 红花的微生物污染状况分析 [J]. 药物分析杂志, 2015, 35(7): 1257-1262.

[11] 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.

[12] 周爽, 钱文静. 中药饮片污染耐胆盐革兰阴性菌的考察 [J]. 中国药品标准, 2014, 15(6): 423-425.

[13] 绳金房, 杨晓莉, 李辉. 陕西省 12 种中药饮片微生物污染调查及风险评估 [J]. 西北药学杂志, 2016, 31(6): 608-612.

[14] 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(1): 52-56.

[15] 林铁豪, 张帆, 曾璞. 中药饮片鱼腥草中微生物污染情况研究 [J]. 广东化工, 2018, 45(8): 86-93.

[16] 刘洪祥, 曹晓云. 中药饮片中控制菌的研究及分析 [J]. 天津药学, 2017, 29(4): 11-17.

[17] 谢文明, 张敏, 潘建文. 常用中药饮片两头尖和桑寄生中微生物污染的检测及分析 [J]. 中国药理学杂志, 2015, 50(18): 1630-1633.

[18] 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.

[19] 魏建功, 蔡妙英, 陈怀涛. 地衣芽孢杆菌对鸡致病性的研究 [J]. 中国兽医杂志, 1996, 22(6): 3-5.

[20] 华春珍, 娄国强, Richard•Mally. 少动鞘氨醇单胞菌及

- 其感染的临床特点和治疗 [J]. 中华传染病杂志, 2012, 30(12): 751-754.
- [21] 江南, 苏彦萍, 赵凤玲, 等. 一起由蜡样芽胞杆菌致吐毒素引起的食物中毒案例分析 [J]. 中国卫生检验杂志, 2018, 28(19): 2402-2403.
- [22] 秦庆学, 徐保红. 从臀部脓疱中分离出短芽胞杆菌 [J]. 中国人兽共患病学报, 1995, 11(5): 61-62.
- [23] 刘富来, 冯翠兰. 猪源缓慢葡萄球菌的分离鉴定及致病性研究 [J]. 中国动物检疫, 2011, 28(4): 56-58.
- [24] 乔雪飞, 邱香, 吴佳瑾, 等. 2016 年上海市松江区婴幼儿食品中阪崎肠杆菌污染状况分析 [J]. 环境与职业医学, 2017, 34(7): 612-616.
- [25] 李金钟. 62 株黏膜炎莫拉氏菌的分离鉴定及其临床意义 [J]. 临床检验杂志, 1994(S1): 71-72.
- [26] 黄俊云, 李小波, 裴显峰, 等. 临床标本巴斯德菌的分离及耐药性分析 [J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2009, 29(7): 622.
- [27] 谢琴秀, 熊自忠. 21 例铅黄肠球菌感染的临床特征分析 [J]. 安徽医药, 2008, 12(10): 925-926.
- [28] 徐艳, 常勇杰, 汪在华, 等. 患儿导管相关性放射根瘤菌血流感染分析 [J]. 中华急诊医学杂志, 2015, 24(6): 608-611.
- [29] 郭凤丽, 杨伟. 环状芽胞杆菌致乳腺脓肿 1 例 [J]. 中华医院感染学杂志, 2007, 17(7): 830.
- [30] 冯婷婷, 王佳贺. 阴沟肠杆菌感染与耐药机制的研究进展 [J]. 中国人兽共患病学报, 2017, 33(10): 933-937.
- [31] 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.
- [32] 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.
- [33] 江志杰, 刘文杰, 张光华, 等. 鳖甲中污染微生物检测、分离鉴定及耐药性分析 [J]. 中药材, 2014, 37(10): 1739-1742.
- [34] Vergadi E, Bitsori M, Maraki S, et al. Community-onset carbapenem-resistant, *Klebsiella pneumoniae*, urinary tract infections in infancy following NICU hospitalisation [J]. *J Pediatr Urol*, 2017, doi: 10.1016/j.jpuro.2017.02.008.
- [35] 何立东, 吕慧萍, 吕焕昌. 酷似气性坏疽的产气肠杆菌感染一例 [J]. 中华内科杂志, 2010, 49(7): 605.
- [36] Grantham W J, Funk S S, Schoenecker J G. *Leclercia adecarboxylata* musculoskeletal infection in an immune competent pediatric patient: An emerging pathogen? [J]. *Case Rep Orthop*, 2015, doi: 10.1155/2015/160473.
- [37] 沈海英, 顾珉. 30 批中药饮片检出 5 株非脱羧勒克菌 [J]. 中国药事, 2015, 29(9): 926-931.
- [38] 胡光春, 杨月莲, 刘辉, 等. 阪崎肠杆菌致病性及致病机理研究进展 [J]. 中国病原生物学杂志, 2011, 6(8): 626-628.
- [39] Högenauer C, Langner C, Beubler E, et al. *Klebsiella oxytoca* as a causative organism of antibiotic-associated hemorrhagic colitis [J]. *New Engl J Med*, 2006, 355(23): 2418-2426.
- [40] Venincasa V D, Callegan M, Astley R A, et al. Contact lens-related polymicrobial keratitis from *Pantoea agglomerans* and *Escherichia vulneris* [J]. *Am J Ophthalmol Case Rep*, 2016, doi: 10.1016/j.ajoc.2016.01.004.
- [41] Trabulsi L R, Rogéria K, Gomes T A T. Typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli* [J]. *Emerg Infect Dis*, 2002, 8(5): 508-513.
- [42] Reina J, Borrell N, Llopart I. Community-acquired bacteremia caused by *Serratia plymuthica*. Case report and review of the literature [J]. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 1992, doi: 10.1016/0732-8893(92)90087-A.
- [43] 王甫忠, 高燕渝, 吕晓菊. 奈特尔氏西地西菌肺部感染 1 例 [J]. 华西医学, 2004, 19(3): 487-488.
- [44] 刘燕, 刘萍. 河生肠杆菌 2 群致患者左乳房感染 1 例 [J]. 检验医学与临床, 2014, 11(1): 137-138.
- [45] Kimura J, Sasaki K. *Yersinia pseudotuberculosis* infection intractable by antibiotics: A rare case report [J]. *Int J Surg Case Rep*, 2016, doi: 10.1016/j.ijscr.2016.02.039.
- [46] Craig J. Acute pyelonephritis in a child caused by *Proteus penneri* [J]. *Aust N Z J Med*, 1997, 27(3): 347-348.
- [47] Temmerman R, Huys G, Swings J. Identification of lactic acid bacteria: Culture-dependent and culture-independent methods [J]. *Trends Food Sci Tech*, 2004, 15(7/8): 348-359.
- [48] 贾珉. 235 株血培养病原菌分布及药物敏感性分析 [J]. 中华医院感染学杂志, 2012, 22(19): 4372-4373.
- [49] 杨燕, 蒋波, 鲍英, 等. 四种药品微生物快速鉴定技术的方法学一致性评价 [J]. 中国药学杂志, 2016, 51(22): 1967-1971.
- [50] Garon D, Kaddoumi A E, Carayon A, et al. FT-IR spectroscopy for rapid differentiation of *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus parasiticus* and characterization of aflatoxigenic isolates collected from agricultural environments [J]. *Mycopathologia*, 2010, 170(2): 131-142.
- [51] Amiali N M, Mulvey M R, Sedman J, et al. Rapid identification of coagulase-negative staphylococci by Fourier transform infrared spectroscopy [J]. *J Microbiol Methods*, 2007, doi: 10.1016/j.mimet.2006.08.010.

(下转第 2256 页)

- 1986, 25(6): 1494-1495.
- [12] 王海香, 申照静, 杜艳丽, 等. 胡桃属植物青皮的化学成分及作用机理研究进展 [J]. 生物化学工程, 2008, 24(1): 47-52.
- [13] 周媛媛, 刘兆熙, 孟颖. 青龙衣有效部位化学成分研究 [J]. 中草药, 2014, 45(16): 2303-2306.
- [14] 王宏歌. 胡桃楸外果皮活性成分的研究 [D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2013.
- [15] 周媛媛, 刘雨新, 蒋艳秋. 青龙衣抗肿瘤有效部位的化学成分研究 [J]. 中草药, 2016, 47(17): 2879-2983.
- [16] 张建斌. 甘肃青龙衣核桃青皮化学成分的研究 [D]. 兰州: 西北师范大学, 2009.
- [17] Binder R G, Benson M E, Flash R A, *et al.* Eight 1,4-naphthoquinones from *Juglans* [J]. *Phytochemistry*, 1989, 28(10): 2799-2801.
- [18] Liu L J, Li W, Koike K, *et al.* New α -tetralonyl glucosides from the fruit of *Juglans mandshurica* [J]. *Chem Pharm Bull*, 2004, 52(5): 566-569.
- [19] 高小宁, 孙晓飞, 黄国兴. 核桃楸青皮中的一个新四氢萘醌化合物 [J]. 中成药, 2013, 35(7): 1487-1489.
- [20] 王艳梅. 胡桃楸青果皮生物活性及活性成分研究 [D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2008.
- [21] Chen G, Pi X M, Yu C Y. A new naphthalenone isolated from the green walnut husks of *Juglans mandshurica* Maxim. [J]. *Nat Prod Res*, 2015, 29(2): 174-179.
- [22] 戚雅君, 翁琳, 王增. 山胡桃的化学成分及药理活性研究进展 [J]. 中国医院药学杂志, 2010, 30(19): 18-20.
- [23] 张建斌, 柳军玺, 查飞, 等. 青龙衣的化学成分研究 [J]. 中草药, 2009, 40(6): 847-849.
- [24] 刘丽娟, 齐凤琴, 龚显峰. 北青龙衣中萘醌类衍生物细胞毒活性研究 [J]. 中国现代应用药学, 2010, 27(7): 574-577.
- [25] 张野平, 杨志博, 景永奎. 胡桃醌对肿瘤细胞的增殖抑制作用和抗菌作用 [J]. 沈阳药学院学报, 1993, 10(4): 271-274.
- [26] Yang Q, Yao Q S, Kuang Y, *et al.* Antimicrobial and cytotoxic juglones from the immature exocarps of *Juglans mandshurica* [J]. *Nat Prod Res*, 2018, doi: 10.1080/14786419.2018.1468326.
- [27] 孙墨珑, 宋湛谦, 方桂珍. 核桃楸叶乙醇提取物的抑菌活性及活性成分分析 [J]. 林产化学与工业, 2007, 27(增刊): 81-84.
- [28] Zhou Y Y, Yang B Y, Jiang Y Q, *et al.* Studies on cytotoxic activity against HepG-2 cells of naphthoquinones from green walnut husks of *Juglans mandshurica* Maxim. [J]. *Molecules*, 2015, doi: 10.3390/molecules200915572.
- [29] 吴德玲, 陈仕云, 刘劲松. 山核桃外蒲壳化学成分及抗肿瘤活性研究 [J]. 中药材, 2011, 34(7): 1055-1057.
- [30] 黄成刚, 阎新佳, 邹晓祺. 青龙衣的化学成分及抗肿瘤活性研究 [J]. 哈尔滨商业大学学报, 2014, 34(5): 517-541.
- (上接第2250页)
- [52] 陈伟盛, 关倩明, 朱荣峰, 等. 药品微生物限度检查中微生物污染的鉴定和溯源分析 [J]. 药物分析杂志, 2014, 3(1): 58-63.
- [53] 杨丽君, 王静, 李兆杰, 等. 傅里叶变换红外光谱技术用于细菌检测的影响因素 [J]. 食品科学, 2013, 34(8): 190-194.
- [54] Angeletti S. Matrix assisted laser desorption time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) in clinical microbiology [J]. *J Microbiol Methods*, 2016, doi: 10.1016/j.mimet.2016.09.003.
- [55] Quéro L, Girard V, Pawtowski A, *et al.* Development and application of MALDI-TOF MS for identification of food spoilage fungi [J]. *Food Microbiol*, 2018, doi: 10.1016/j.fm.2018.05.001.
- [56] Veloo A C, Welling G W, Degener J E. The identification of anaerobic bacteria using MALDI-TOF MS [J]. *Anaerobe*, 2011, doi: 10.1016/j.anaerobe.2011.03.026.
- [57] Popović N T, Kazazić S P, Strunjak-Perović I, *et al.* Differentiation of environmental aquatic bacterial isolates by MALDI-TOF MS [J]. *Environ Res*, 2017, doi: 10.1016/j.envres.2016.09.020.
- [58] Schumann P, Pukall R. The discriminatory power of ribotyping as automatable technique for differentiation of bacteria [J]. *Syst Appl Microbiol*, 2013, 36(6): 369-375.
- [59] Fang X, Wang X, Yang S, *et al.* Evaluation of the microbial diversity in amyotrophic lateral sclerosis using high-throughput sequencing [J]. *Front Microbiol*, 2016, doi: 10.3389/fmicb.2016.01479.