

对含中药成分保健食品微生物检验方法的探讨

刘冬玲, 蒋波, 陈奇知, 杨美成*

(上海市食品药品检验所, 上海 201203)

摘要: **目的** 分析含中药成分的保健食品进行微生物检验时所采用的菌落计数和控制菌检查方法的合理性。**方法** 根据 GB16740-2014《保健食品》中的微生物限量要求, 结合《中国药典》附录中微生物限度检查法和 GB4789《食品微生物学检验》, 对固态茶类和液态口服液类 10 批次含中药成分的保健食品进行了抑菌性筛查及消除的方法学验证。**结果** 对菌落计数采用常规法进行方法学验证时, 筛查出 3 批供试品存在抑菌性: 供试品对菌落计数的抑菌性通过培养基稀释法不能完全消除, 但可通过中和法消除; 对控制菌检查采用常规法进行方法学验证时, 筛查出 4 批供试品存在抑菌性, 供试品对控制菌金黄色葡萄球菌的抑菌性通过培养基稀释法和中和法等均未能消除。**结论** 建议采用含中和剂的琼脂培养基进行计数, 并在试验中增加阳性对照菌株进行监控, 含中药成分保健食品的检验方法应参照《中国药典》进行方法学验证。

关键词: 中药成分; 保健食品; 方法学验证; 微生物检验

Discussion on the method of microbiological test for health foods including Chinese herbal ingredients

LIU Dong-Ling, JIANG Bo, CHEN Qi-Zhi, YANG Mei-Cheng*

(Shanghai Institute for Food and Drug Control, Shanghai 201203, China)

ABSTRACT: Objective To analyze the rationality of the methods of colony counting and specified micro-organisms in microbial tests for health foods including Chinese herbal ingredients. **Methods** According to GB16740-2014 *Health food* microbial limit requirements, *Chinese Pharmacopoeia* 2010 *Appendix* microbial limit tests and GB4789 *Food microbiological analysis*, microbiological test methods of 10 kinds of health foods including Chinese herbal ingredients (tea in solid form and oral liquid) were validated. **Results** During the methodology validation by conventional method, antibiotic effects of 3 samples on microbial enumeration tests could be eliminated by neutralizing method rather than dilute method. However, antibiotic effects of 4 samples on test of specified microorganism (*Staphylococcus aureus*) could not be eliminated by the test methods. **Conclusion** Method of neutralizing agar medium is recommended in microbial enumeration. The positive control strains are also added in the whole experimental process. More reasonable methods which are set up to detect microbe in health foods including Chinese herbal ingredients by reference to *Chinese Pharmacopoeia* should be validated.

KEY WORDS: Chinese herbal ingredients; health foods; method validation; microbiological test

*通讯作者: 杨美成, 博士, 主任药师, 主要研究方向为实验室质量管理、药物分析与微生物学检验。E-mail: yangmeicheng@vip.sina.com

*Corresponding author: YANG Mei-Cheng, Ph.D, Chief Pharmacist, Shanghai Institute for Food and Drug Control, Shanghai 201203, China. E-mail: yangmeicheng@vip.sina.com

1 引言

随着物质生活水平的提高,保健食品逐渐成为人们尤其是中老年人群青睐的消费产品。不少保健食品的保健功能是通过产品中含有的药食两用的中药成分来实现的^[1]。中药成分即中药材,取自植物的根、茎、叶、花、果实和动物或其脏器。由于来源复杂,药材原料中带有大量的微生物,易使含中药成分的保健食品受微生物的污染^[2,3]。另外,很多中药成分本身具有抑菌作用,它们的存在可能会抑制微生物的生长进而对检验结果产生影响^[4-7]。

现有保健食品微生物检验方法大多参照食品安全国家标准 GB 4789《食品微生物学检验》^[8]。有研究表明,保健食品检验时未经方法学验证,易造成检验结果呈现假阴性^[9-12]。《中国药典》强调了方法学验证的重要性,如建立某一药品的微生物限度检查法时,需按照要求进行菌落计数和控制菌检查方法的验证,以确认所采用的方法的适用性^[13]。

本研究将药品方法学验证引入保健食品的微生物学检验,选取了市场中较多、检测频率较高的固态茶类和液态口服液类共10批次含中药成分的保健食品进行试验。通过不同方法验证菌落计数和控制菌检查结果的比较,探究含中药成分的保健食品微生物检验方法的合理性,为完善保健食品的微生物学检验方法提供理论依据。

2 材料与方法

2.1 材料和试剂

2.1.1 材料

10 批含中药成分的保健食品(所含主要中药成分见表 1)分别为固态茶类产品:碧生源减肥茶(批号:4131001),碧生源肠润茶(批号:1130103),回春花牌通秘茶(批号:131203),东方保健茶(批号:130701);液态口服液类产品:无限极男仕口服液(批号:13F05A01A),血尔口服液(批号:KB115),长兴牌参茸口服液(批号:KSR581215),太太美容口服液(批号:TLJ0570),无限极常欣卫口服液(批号:14D02B06B),太太血乐口服液(批号:TAK0604)。

2.1.2 培养基

血琼脂平板(批号:E0326Y)、7.5%氯化钠肉汤培养基(批号:3302004)购自广东环凯微生物科技有限公司;亚硫酸铋(BS)琼脂平板(批号:150508)购自上海科玛嘉微生物技术有限公司;缓冲蛋白胨水(BPW,批号:150420)、月桂基硫酸盐胰蛋白胨(LST)肉汤(批号:150320)、煌绿乳糖胆盐(BGLB)肉汤(批号:150522)购自上海盛思生化科技有限公司;平板计数琼脂培养基(批号:150526)、0.85%生理盐水(批号:150526)、孟加拉红培养基(批号:150526)、Baird-Parker 平板(批号:150527)、四硫磺酸钠煌绿(TTB)增菌液(批号:150526)、木糖赖氨酸脱氧胆盐(XLD)琼脂(批号:150526)为上海市食品药品检验所自配。

表 1 含中药成分的保健食品所含主要中药成分
Table 1 Chinese herbal ingredients in the tested health foods

样品分类	样品名称	主要中药成分
固态茶类	碧生源减肥茶	金银花、决明子、番泻叶等
	碧生源常润茶	决明子、焦大麦、生川军等
	回春花牌通秘茶	土茯苓、沙参、番泻叶、草决明等
	东方保健茶	番泻叶、决明子等
液态口服液类	无限极男仕口服液	何首乌、巴戟天、枸杞子、核桃肉、桂圆肉、金樱子等
	血尔口服液	黄芪、当归等
	长兴牌参茸口服液	人参、鹿茸、淫羊藿、黄精、枸杞子等
	太太美容口服液	制首乌、当归、熟地黄、白芍、郁金、红花、川芎等
	无限极常欣卫口服液	山药、党参、茯苓、白扁豆、砂仁、白术(炒)等
	太太血乐口服液	熟地黄、当归、川芎、白芍等

2.1.3 菌种

实验用菌种包括大肠埃希菌(*Escherichia coli*) [CMCC(B) 44 102]、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) [CMCC(B) 26003]、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) [CMCC(B) 63501]、白色念珠菌(*Candida albicans*) [CMCC (F) 98 001]、黑曲霉(*Aspergillus niger*) [CMCC(F) 98003]、乙型副伤寒沙门菌(*Salmonella paratyphi B*) [CMCC(B) 50 094], 均购自中国医学细菌保藏中心。

2.2 实验方法

实验参照《中国药典》2010年版一部附录微生物限度检查法和 GB 4789 食品安全国家标准《食品微生物学检验》进行。

2.2.1 菌液制备

计数方法验证: 将大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、白色念珠菌和黑曲霉稀释成每 1 mL 含 50~100 CFU 试验菌的菌悬液。控制菌检查方法验证: 将金黄色葡萄球菌、沙门菌和大肠埃希菌稀释成每 1 mL 含 10~100 CFU 试验菌的菌悬液。

2.2.2 供试液制备

计数方法验证: 固态茶类产品称取 25 g 至 225 mL 稀释液中, 以 1:10 样品匀液为供试液; 液态口服液类产品以原液为供试液。

根据 GB 16740-2014《保健食品》^[14]微生物限量表要求, 检测金黄色葡萄球菌、沙门菌和大肠菌群。控制菌检查方法验证金黄色葡萄球菌(或沙门氏菌)检验时, 取样品 25 g(mL)加入 225 mL 7.5%氯化钠肉汤(或 225 mL 缓冲蛋白胨水)作为供试液; 大肠菌群计数, 取样品 25 g(mL)至 225 mL 稀释液中, 制备成 1:10 样品匀液, 然后进行梯度稀释, 固态产品选择 1:10 的样品匀液为起始稀释度, 液态产品选择原液为起始稀释度。

2.2.3 抑菌性筛查试验(常规法)

计数方法验证: 试验组取制备好的供试液 1 mL 和(50~100 CFU)试验菌 1 mL, 分别注入平皿中并倾注琼脂培养基; 试验组、菌液组和供试品对照组培养后根据计数结果计算回收率, 回收率应不低于 70%, 判断为常规法适用。

控制菌检查方法验证: 试验组分别直接添加 10~100 CFU 的金黄色葡萄球菌、沙门菌和大肠埃希菌至供试液中; 试验组、阳性对照组和阴性对照组均

按相应控制菌检查法进行检查, 试验组和阳性对照组检测出试验菌, 阴性对照组无菌生长, 判断为常规法适用。

2.2.4 抑菌性消除试验(培养基稀释法、中和法和两种方法联用)

经常规法验证, 菌落计数回收率低于 70% 和控制菌未能检出的供试品, 可采用培养基稀释法和中和法等消除供试品中的抑菌性, 回收率的计算和控制菌的检查步骤参照常规法。

培养基稀释法: 计数方法验证时试验组取制备好 1 mL 供试液等量分注 5 个平皿(0.2 mL/皿), 每皿加入 1 mL(50~100 CFU)试验菌, 计算每 1 mL 供试液的平均菌落数; 控制菌检查方法验证时, 加大 2.2.2 中增菌培养基的体积至 975 mL。

中和法: 选取聚山梨酯 80 和卵磷脂作为中和剂^[13,15], 计数方法验证时将中和剂加入琼脂培养基中; 控制菌检查方法验证时, 将中和剂加入增菌培养基中。

3 结果和讨论

3.1 筛查抑菌性的结果

3.1.1 菌落计数(常规法)

采用常规法对菌落计数进行 2 次独立的验证试验, 结果基本一致(见表 2)。10 批供试品中 7 批供试品的试验菌回收率均高于 70%, 说明可采用常规法进行菌落计数测定; 2 批固态茶类供试品碧生源减肥茶和碧生源常润茶对金黄色葡萄球菌和枯草芽孢杆菌有较强的抑制作用, 回收率均小于 70% 且接近 0; 1 批液态口服液供试品中对金黄色葡萄球菌有抑制作用, 其中 1 次试验的回收率小于 70%, 对枯草芽孢杆菌有明显的抑制作用, 回收率均小于 70% 且接近 0, 说明采用常规法进行菌落计数不适用于这 3 批供试品。固态茶类供试品和液态口服液类供试品中的中药成分可能不同程度地对菌落计数产生抑菌作用。

3.1.2 控制菌检查(常规法)

采用常规法对控制菌检查进行验证(见表 3), 10 批供试品中 6 批液态口服液供试品检出了试验菌, 说明可采用常规法进行控制菌检查; 4 批固态茶类供试品均无法检出金黄色葡萄球菌, 说明对金黄色葡萄球菌有较强的抑制作用, 采用常规法进行金黄色葡萄球菌检验不适用于这 4 批供试品。

表 2 菌落计数的回收率(常规法%)
Table 2 Recovery of microbial enumeration tests (general method%)

样品分类	样品名称	大肠埃希氏菌		金黄色葡萄球菌		枯草芽孢杆菌		白色念珠菌		黑曲霉	
		①	②	①	②	①	②	①	②	①	②
固态茶类	碧生源减肥茶	80.0	86.1	0	7.0	0	4.4	109.5	85.1	77.6	83.6
	碧生源常润茶	71.8	90.3	0	1.17	0	2.94	98.4	89.6	75.9	73.8
	回春花牌通秘茶	91.9	82.2	89.7	86.1	86.4	82.5	91.6	86.0	82.8	98.3
	东方保健茶	90.7	81.2	85.2	94.4	75.3	86.0	79.5	75.4	86.2	93.3
液态口服液类	无限极男仕口服液	100	82.2	102.4	108.3	103.9	82.5	97.7	75.4	93.1	88.3
	血尔口服液	101.5	92.1	56.0	77.8	1.30	0.00	95.3	100	77.6	93.3
	长兴牌参茸口服液	103.1	94.1	90.5	75	81.8	91.2	97.7	94.7	87.9	98.3
	太太美容口服液	92.3	80.2	71.4	75	98.7	96.5	95.3	80.7	81	76.7
	无限极常欣卫口服液	98.5	75.2	91.7	84.7	83.1	78.9	81.4	89.5	93.1	88.3
	太太血乐口服液	96.9	79.2	97.6	101.4	80.5	91.2	94.2	91.2	93.1	101.7

表 3 控制菌的验证结果(常规法)
Table 3 Verification results of specified microorganisms (general method)

样品分类	样品名称	沙门菌	金黄色葡萄球菌	大肠菌群(试验菌: 大肠埃希菌)		
				固体 1:10 液体原液(10 mL)	固体 1:10 液体原液(1 mL)	固体 1:100 液体 1:10(1 mL)
固态茶类	碧生源减肥茶	检出	未检出	检出	检出	检出
	碧生源常润茶	检出	未检出	检出	检出	检出
	回春花牌通秘茶	检出	未检出	检出	检出	检出
	东方保健茶	检出	未检出	检出	检出	检出
	无限极男仕口服液	检出	检出	检出	检出	检出
液态口服液类	血尔口服液	检出	检出	检出	检出	检出
	长兴牌参茸口服液	检出	检出	检出	检出	检出
	太太美容口服液	检出	检出	检出	检出	检出
	无限极常欣卫口服液	检出	检出	检出	检出	检出
	太太血乐口服液	检出	检出	检出	检出	检出

3.2 抑菌性消除的结果

3.2.1 菌落计数(培养基稀释法和中和法)

常规法不适用的 3 批供试品采用培养基稀释法(供试液 0.2 mL/皿)和中和法(含 0.1%卵磷脂和 0.7%聚山梨酯 80 的琼脂培养基)对敏感菌株金黄色葡萄球菌和枯草芽孢杆菌分别进行验证试验(见表 4): 碧生源减肥茶和碧生源常润茶的敏感菌株回收率均高于 70%, 说明两种方法能消除 2 批固态茶类供试品的抑菌性; 血尔口服液采用培养基稀释法后, 枯草芽孢杆菌的回收率仍低于 70%, 但采用中和法后金黄色葡萄球菌和枯草芽孢杆菌的回收率均高于 70%, 说明中和法能消除血尔口服液的抑菌性。

3.2.2 控制菌检查(培养基稀释法、中和法和两种方法联用)

常规法不适用的 4 批供试品分别采用培养基稀释法(7.5%氯化钠肉汤体积增至 975 mL)、中和法 1(含 0.1%卵磷脂和 0.7%聚山梨酯 80 的 225 mL7.5%氯化钠肉汤)、中和法 2(含 0.3%卵磷脂、3%吐温 80 和 0.1%组氨酸的 225 mL7.5%氯化钠肉汤)和培养基稀释法/中和法 2 联用的方法(含 0.3%卵磷脂、3%吐温 80 和 0.1%组氨酸的 975 mL7.5%氯化钠肉汤)对敏感菌株金黄色葡萄球菌分别进行了验证试验(见表 5): 4 批固态茶类供试品仍无法检出金黄色葡萄球菌, 说明这几种方法均未能消除供试品对金黄色葡萄球菌的抑菌作用。

表 4 菌落计数的回收率(培养基稀释法和中和法%)
Table 4 Recovery of microbial enumeration tests (dilute method and neutralizing method %)

样品分类	样品名称	培养基稀释法				中和法			
		金黄色葡萄球菌		枯草芽孢杆菌		金黄色葡萄球菌		枯草芽孢杆菌	
		①	②	①	②	①	②	①	②
固态茶类	碧生源减肥茶	95.1	92.9	95.1	77.9	97.4	87.3	73.4	74.6
	碧生源常润茶	90.2	97.6	95.1	87.0	96.2	76.2	95.3	76.1
液态口服液类	血尔口服液	88.4	93.8	0.0	0.0	100.0	85.1	85.1	95.5

表 5 控制菌的验证结果(培养基稀释法、中和法等)
Table 5 Results of test for specified microorganisms (dilute method and neutralizing method, etc)

样品分类	样品名称	控制菌: 金黄色葡萄球菌			
		培养基稀释法	中和法 1: 含 0.1% 卵磷脂、0.7% 吐温 80	中和法 2: 含 0.3% 卵磷脂、3% 吐温 80 和 0.1% 组氨酸	培养基稀释法+中和法 2
固态茶类	碧生源减肥茶	未检出	未检出	未检出	未检出
	碧生源常润茶	未检出	未检出	未检出	未检出
	回春花牌通秘茶	未检出	未检出	未检出	未检出
	东方保健茶	未检出	未检出	未检出	未检出

4 结 论

本研究通过对 10 批含中药成分保健食品抑菌性筛查, 结果表明固态茶类供试品和液态口服液类供试品在菌落计数和控制菌检查时均存在抑菌性, 抑菌性可能与试验用产品成分中含决明子、番泻叶、黄芪等中药成分有关^[4-7]。根据方法学验证结果, 建议对含中药成分保健食品采用含中和剂(0.1% 卵磷脂和 0.7% 聚山梨酯 80)的琼脂培养基进行计数。

本研究试验表明, 含中药成分的保健食品微生物检验结果存在假阴性的可能, 建议在试验中增加阳性对照菌株, 同时不断完善保健食品微生物的检验方法, 从而为监管部门对保健食品相关企业的监督提供技术支撑。

参考文献

[1] 姜海涛. 食药真菌在保健食品中的应用研究[J]. 食品工业, 2011, 9: 111-113.
Jiang HT. Application study of edible and medicinal fungus in functional food [J]. Food Ind, 2011, 9: 111-113.
[2] 张波. 我国保健食品原料的特点及安全学问题 [J]. 食品科学, 2011, 32(21): 298-300.

Zhang B. Characteristics and safety of Chinese functional food materials [J]. Food Sci, 2011, 32(21): 298-300.
[3] 付玉生. 1257 份保健食品微生物污染状况及影响因素探讨[J]. 中国卫生检验杂志, 2013, 23(2): 489-491.
Fu YS. Discussion on microbial contamination condition and impact factors of 1257 health food samples [J]. Chin J Health Lab Technol, 2013, 23(2): 489-491.
[4] 程玲玲, 孙梅, 涂凌. 决明子提取物对植物病原菌的抑菌活性初探[J]. 四川理工学院学报(自然科学版), 2005, 18(2): 53-55.
Cheng LL, Sun M, Tu L. Inhibition mechanism of extract of cassiaobtusifolia to plantpathogens [J]. J Sichuan Univ Sci Eng (Nat Sci Ed), 2005, 18(2): 53-55.
[5] 李娟, 张学顺, 傅春升. 中药抗菌作用的研究进展[J]. 中国药业, 2014, 23(2): 90-93.
Li J, Zhang XS, Fu CS. The development of traditional Chinese medicine in antibacterial [J]. Chin Pharm, 2014, 23(2): 90-93.
[6] Cutler RR, Wilson P. Antibacterial activity of a new, stable, aqueous extract of allicin against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* [J]. Br J Biomed Sci, 2004, 61(2): 1-4.
[7] 邱世翠, 荣先国, 邱大琳. 黄连的体外抑菌作用研究[J]. 时珍国医国药, 2002, 13(4): 196-198.
Qiu SC, Rong XG, Di DL, et al. The *in vitro* growth inhibition effect of *coptis chinensis Frach* (CCF) on bacteria [J]. Lishizhen

- Med Mater Med Res, 2002, 13(4): 196–198.
- [8] GB 4789.10-2010 食品安全国家标准 食品微生物学检验[S].
GB 16740-2014 National food safety standard-Food microbiological examination [S].
- [9] 特玉香, 王文捷, 祁文娟, 等. 保健(功能)食品卫生微生物学检验方法的探讨[J]. 中国药事, 2008, 22(7): 594–597.
Te YX, Wang WJ, Qi WJ, *et al.* Discussion on the method of microbiological examination for health(functional)foods hygiene [J]. Chin Pharm Aff, 2008, 22(7): 594–597.
- [10] 特玉香, 古丽巴哈尔托乎提, 杨洪森, 等. 保健食品微生物限度检查的方法学验证[J]. 药物分析杂志, 2008, 28(2): 270–274.
Te YX, Gulibahaer T, Yang HS, *et al.* Validation of method in microbial limit tests for health foods [J]. Chin J Pharm Anal, 2008, 28(2): 270–274.
- [11] 王似锦, 刘文杰, 孙伟, 等. 保健食品微生物检验方法验证的分类研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2013, 23(14): 2905–2908.
Wang SJ, Liu WJ, Sun W, *et al.* Classification of validation method in microbiological test for health food [J]. Chin J Health Lab Technol, 2013, 23(14): 2905–2908.
- [12] 王国琴. 保健(功能)食品卫生微生物学检验方法的探讨[J]. 中国现代医生, 2012, 50(33): 69–70.
Wang GQ. Discussion on the method of health (functional) microbiological examination [J]. Chin Mod Doc, 2012, 50(33): 69–70.
- [13] 国家药典委员会. 中国药典[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010.
The Pharmacopoeia Committee. Chinese pharmacopoeia [M]. Beijing: China Medical Science Press, 2010.
- [14] GB 16740-2014 食品安全国家标准 保健食品[S].
GB 16740-2014 National food safety standard-Health food [S].
- [15] 张光华, 余立. 聚山梨酯 80 和卵磷脂在化学药微生物限度检查时的中和作用[J]. 药物分析杂志, 2008, (7): 1127–1130.
Zhang GH, Yu L. Neutralization of antibacterial activity of drugs in microbial limit test by polysorbate 80 and lecithin [J]. Chin J Pharm Anal, 2008, (7): 1127–1130.

(责任编辑: 杨翠娜)

作者简介



刘冬玲, 主管技师, 主要研究方向为微生物学检验。

E-mail: 13636358057@163.com



杨美成, 博士, 主任药师, 主要研究方向为实验室质量管理、药物分析与微生物学检验。

E-mail: yangmeicheng@vip.sina.com