

# B 族维生素泡腾片中微生物限度方法的研究

刘长富, 蔡伟江\*, 彭婷婷

(汤臣倍健股份有限公司, 珠海 519040)

**摘要:** **目的** 开发检测 B 族维生素泡腾片的微生物限度检查新方法。**方法** 通过物理去除样品抑菌性的方法检测 B 族维生素泡腾片的微生物, 通过实验组、供试品对照组、菌液对照组对薄膜过滤法的检测方法进行方法适用性试验。**结果** 实验组菌落数减去供试品对照组菌落数的值与菌液对照组菌落数的比值均在 0.5~2 范围内。**结论** 此法操作简单、科学、准确, 可用于 B 族维生素泡腾片的微生物检查。

**关键词:** B 族维生素泡腾片; 微生物限度检查法; 薄膜过滤法

## Study on the method of microbial limit in B group vitamins effervescent tablets

LIU Chang-Fu, CAI Wei-Jiang\*, PENG Ting-Ting

(By-Health Co., Ltd, Zhuhai 519040, China)

**ABSTRACT: Objective** To develop a new method of microbial limit test for B vitamins effervescent tablets. **Methods** The microorganism of B vitamins effervescent tablets was detected by physical removal bacteriostasis of the samples. In this verification experiment, the applicability of the membrane-filter procedure was tested by the experimental group, the test product control group and the bacterial liquid control group. **Results** The ratio between the bacterial colony number in the experimental group minus the bacterial colony number in the test product control group and the bacterial colony number in the liquid control group was all within the range of 0.5 to 2. **Conclusion** This method is simple, scientific and accurate, and can be used for microbial examination of B vitamins effervescent tablets.

**KEY WORDS:** B vitamins effervescent tablets; microbial limit test; membrane-filter procedure

## 1 引言

B 族维生素泡腾片具有抗菌、抑菌性, 采用国标方法 GB/T 4789.2-2016 检测<sup>[1]</sup>, 发现同一样品的梯度稀释的检测结果不成正比, 经常出现第二稀释梯度的检测结果反而比第一稀释梯度更大的现象, 无法准确地检出样品中的微生物, 会出现假阴性的情况<sup>[2]</sup>。

根据《中国药典》2015 版规定<sup>[3]</sup>, 含抗菌、抑菌成分的样品<sup>[4,5]</sup>, 必须对所采用的检测方法进行验证试验, 可以通过增加稀释液或培养基体积、加入适宜的中和剂或灭活剂、薄膜过滤法等消除干扰物的抑菌活性, 确保测定方法

的可靠性。

本研究采用薄膜过滤法<sup>[6,7]</sup>, 孔径为 0.45  $\mu\text{m}$ , 直径为 50 mm, 使用时, 确保滤膜在过滤前后的完整性, 添加样品后, 通过添加定量的 0.1% 无菌蛋白胨溶液进行冲洗, 使用无菌镊子将滤膜转移至相应培养基上, 菌面朝上, 每株试验菌每种培养基制备 2 张滤膜。通过对比薄膜过滤法和平皿法<sup>[8]</sup>, 消除干扰物的抑菌活性<sup>[9,10]</sup>, 对细菌回收率进行统计。

本研究通过建立 B 族维生素泡腾片的微生物限度检测方法<sup>[11,12]</sup>, 进行验证以及研究 B 族维生素泡腾片抑菌实验<sup>[13]</sup>, 以期 B 族维生素泡腾片的检测提供科学依据。

\*通讯作者: 蔡伟江, 工程师, 主要研究方向为食品质量与安全。E-mail: 714524253@qq.com

\*Corresponding author: CAI Wei-Jiang, Engineer, By-Health Co., Ltd. Zhuhai 519040, China. E-mail: 714524253@qq.com

## 2 材料与方法

### 2.1 材料与仪器

培养基: PCA 琼脂培养基、孟加拉红琼脂培、营养肉汤培养基、改良马丁琼脂培养基(广东环凯微生物有限公司)。

稀释液: pH7.0 的无菌氯化钠蛋白胨、氯化钠(广东环凯微生物有限公司)。

对照菌: 金黄色葡萄球菌 ATCC6538、大肠埃希菌 ATCC25922、枯草芽孢杆菌 ATCC6633、酿酒酵母 ATCC9763、黑曲霉 ATCC16404(广东省微生物菌种保藏中心)。

供试品: B族维生素泡腾片(汤臣倍健股份有限公司)。

仪器: BSC-1600IIA2 生物安全柜(苏州安泰空气技术有限公司); QL-866 振荡器(海门市其林贝尔仪器制造有限公司); EI-FitTM 通用型实验室过滤系统(德国默克公司); LT1002 E 电子天平(常熟市天量仪器有限公司)

### 2.2 实验方法

#### 2.2.1 菌液制备

取金黄色葡萄球菌, 大肠埃希菌, 枯草芽孢杆菌 3 种菌液的新鲜培养物, 分别接种于 100 mL 营养肉汤中, 置 36 °C 培养 24 h, 用 0.9% 无菌氯化钠稀释至  $10^{-5}$ ~ $10^{-7}$ , 使每毫升中含菌液不大于 100 CFU, 备用。取酿酒酵母菌的新鲜培养物接种于 100 mL 酿酒肉汤中, 置 28 °C 培养 72 h, 用 0.9% 无菌氯化钠稀释至  $10^{-5}$ , 使每毫升中含菌液不大于 100 CFU, 备用。取黑曲霉的新鲜培养物接种于改良马丁琼脂斜面培养基中, 置 28 °C 培养 5 d, 加 0.9% 无菌氯化钠溶液 3 mL, 将孢子洗脱, 用 0.9% 无菌氯化钠溶液制成每毫升菌液中含孢子数不大于 100 CFU 的孢子混悬液备用。

#### 2.2.2 样品制备

##### (1) 供试液 A 制备

取 5 份含 2475 mL pH7.0 的无菌氯化钠蛋白胨缓冲液, 分别加入黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、枯草芽孢杆菌、酿酒酵母、黑曲霉使每 100 mL 溶液中含标准菌株不大于 100 CFU 后, 再加入 25 g 用研钵研碎的 B 族维生素泡腾片样品, 摇匀, 备用。

##### (2) 供试液 B 制备

取 5 份含 225 mL 0.85% 无菌氯化钠溶液, 分别加入黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、枯草芽孢杆菌、酿酒酵母、黑曲霉使每 1 mL 溶液中含标准菌株不大于 100 CFU, 再加入 25 g 用研钵研碎的 B 族维生素泡腾片样品, 摇匀, 备用。

#### 2.2.3 回收率实验

实验组 A: 取含金黄色葡萄球菌, 大肠埃希菌, 枯草芽孢杆菌的 A 供试液 100 mL 分别用薄膜过滤法过滤, 用 0.1% 无菌蛋白胨溶液冲洗, 每次 100 mL, 冲洗 3 次, 取出滤膜贴于 PCA 琼脂平板上, 同法做 2 个平皿, 置 36 °C 培养

48 h, 计数。取含酿酒酵母菌, 黑曲霉的 A 供试液 100 mL 用薄膜过滤法过滤, 用 0.1% 无菌蛋白胨溶液冲洗, 每次 100 mL, 冲洗 3 次, 取出滤膜贴于孟加拉红琼脂平板上, 同法做 2 个平皿, 置 28 °C 培养 5 d, 计数。

实验组 B: 取含金黄色葡萄球菌, 大肠埃希菌, 枯草芽孢杆菌的 B 供试液 1 mL 分别加入到平皿中, 每种菌液做 2 个平皿, 再注入约 45 °C 溶化的 PCA 琼脂培养基, 置 36 °C 培养 48 h, 计数。取含酿酒酵母菌, 黑曲霉的 B 供试液 1 mL 分别加入到平皿中, 每种菌液做 2 个平皿, 再注入约 45 °C 溶化的孟加拉红琼脂培养基, 置 28 °C 培养 5 d, 计数。

菌液对照组 A: 取 3 份含 2500 mL pH7.0 的无菌氯化钠蛋白胨缓冲液, 分别加入黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、枯草芽孢杆菌, 使每 100 mL 溶液中含标准菌株不大于 100 CFU, 取 100 mL 用薄膜过滤法过滤, 用 0.1% 无菌蛋白胨溶液冲洗, 每次 100 mL, 冲洗 3 次, 取出滤膜贴于 PCA 琼脂平板上, 同法做 2 个平皿, 置 36 °C 培养 48 h, 计数。取 2 份含 2500 mL pH7.0 的无菌氯化钠蛋白胨缓冲液, 分别加入酿酒酵母、黑曲霉使每 mL 溶液中含标准菌株 50~100 CFU, 取 100 mL 用薄膜过滤法过滤, 用 0.1% 无菌蛋白胨溶液冲洗, 每次 100 mL, 冲洗 3 次, 取出滤膜贴于孟加拉红琼脂平板上, 同法做 2 个平皿, 置 28 °C 培养 5 d, 计数。

菌液对照组 B: 取 3 份含 225 mL 0.85% 无菌氯化钠溶液, 分别加入黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、枯草芽孢杆菌使每 1 mL 溶液中含标准菌株不大于 100 CFU, 摇匀, 每种菌液取 1 mL 分别加入到平皿中, 每种菌液做 2 个平皿, 再注入约 45 °C 溶化的 PCA 琼脂培养基, 置 36 °C 培养 48 h, 计数。取 2 份含 225 mL 0.85% 无菌氯化钠溶液, 分别加入酿酒酵母、黑曲霉使每 1 mL 溶液中含标准菌株不大于 100 CFU, 摇匀, 每种菌液取 1 mL 分别加入到平皿中, 每种菌液做 2 个平皿, 再注入约 45 °C 溶化的 PCA 孟加拉红琼脂培养基, 置 28 °C 培养 5 d, 计数。

供试液对照组 A: 取样品 25 g, 加入 2475 mL pH7.0 的无菌氯化钠蛋白胨缓冲液中, 混匀, 取 100 mL 用薄膜过滤法过滤, 用无菌蛋白胨溶液冲洗, 每次 100 mL, 冲洗 3 次, 同法做 4 个平皿, 2 张滤膜贴于 PCA 琼脂平板上, 置 36 °C 培养 48 h, 2 张滤膜贴于孟加拉红琼脂平板上, 置 28 °C 培养 5 d 天, 计数。

供试液对照组 B: 取样品 25 g, 加入 225 mL 0.85% 无菌氯化钠溶液, 摇匀, 取 4 mL 分别加入到 4 个平皿中, 每个平皿 1 mL, 2 个平皿注入约 45 °C 溶化的 PCA 琼脂培养基置 36 °C 培养 48 h, 计数。2 个平皿, 注入约 45 °C 溶化的 PCA 孟加拉红琼脂培养基, 置 28 °C 培养 5 d, 计数。

## 3 结果与分析

本研究通过 3 次平行实验, 按国家标准检测方法实验组的回收率(实验组的平均菌落数-供试液对照组的平均菌

落与菌液对照组的平均菌落数比值)不在 0.5~2 范围, 再采用将样品稀释后, 用薄膜过滤法验证实验组的回收率(实

验组的平均菌落数-供试液对照组的平均菌落与菌液对照组的平均菌落数比值)在 0.5~2 范围。结果见表 1~表 6。

**表 1 样品 1 国标方法验证结果(CFU/mL)**  
**Table 1 Sample 1 verification results (CFU/mL)**

供试液对照组 B	①		②		平均		回收率/%	结论
	0	0	0	0	0	0		
菌种 项目	菌液组 B			实验组 B			回收率/%	结论
	①	②	平均	①	②	平均		
金黄色葡萄球菌	85	78	82	0	0	0	0	不符合规定
大肠埃希菌	94	88	91	0	0	0	0	不符合规定
枯草芽孢杆菌	66	58	62	0	0	0	0	不符合规定
酿酒酵母	77	85	81	45	53	49	60	符合规定
黑曲霉	48	40	44	18	24	21	48	不符合规定

注: 实验组的回收率(实验组的平均菌落数-供试液对照组的平均菌落与菌液对照组的平均菌落数比值)应在 0.5~2 范围内。

**表 2 样品 2 国标方法验证结果(CFU/mL)**  
**Table 2 Sample 2 verification results (CFU/mL)**

供试液对照组 B	①		②		平均		回收率/%	结论
	0	0	0	0	0	0		
菌种 项目	菌液组 B			实验组 B			回收率/%	结论
	①	②	平均	①	②	平均		
金黄色葡萄球菌	85	78	82	0	0	0	0	不符合规定
大肠埃希菌	94	88	91	0	0	0	0	不符合规定
枯草芽孢杆菌	66	58	62	0	0	0	0	不符合规定
酿酒酵母	77	85	81	41	47	44	54	符合规定
黑曲霉	48	40	44	14	16	15	34	不符合规定

注: 实验组的回收率(实验组的平均菌落数-供试液对照组的平均菌落与菌液对照组的平均菌落数比值)应在 0.5~2 范围内。

**表 3 样品 3 国标方法验证结果(CFU/mL)**  
**Table 3 Sample 3 verification results (CFU/mL)**

供试液对照组 B	①		②		平均		回收率/%	结论
	0	0	0	0	0	0		
菌种 项目	菌液组 B			实验组 B			回收率/%	结论
	①	②	平均	①	②	平均		
金黄色葡萄球菌	85	78	82	0	0	0	0	不符合规定
大肠埃希菌	94	88	91	0	0	0	0	不符合规定
枯草芽孢杆菌	66	58	62	0	0	0	0	不符合规定
酿酒酵母	77	85	81	33	38	36	44	不符合规定
黑曲霉	48	40	44	23	18	20	45	不符合规定

注: 实验组的回收率(实验组的平均菌落数-供试液对照组的平均菌落与菌液对照组的平均菌落数比值)应在 0.5~2 范围内。

表 4 样品 1 新方法验证结果(CFU/mL)  
Table 4 Sample 1 verification results (CFU/mL)

供试液对照组 A	①		②		平均		回收率/%	结论
	0		0		0			
菌种 项目	菌液组 A			实验组 A			回收率/%	结论
	①	②	平均	①	②	平均		
金黄色葡萄球菌	48	54	51	50	56	53	104	符合规定
大肠埃希菌	88	76	82	89	80	84	102	符合规定
枯草芽孢杆菌	42	47	44	53	46	50	114	符合规定
酿酒酵母	77	68	72	60	67	64	89	符合规定
黑曲霉	35	31	33	28	25	26	79	符合规定

注: 实验组的回收率(实验组的平均菌落数-供试液对照组的平均菌落与菌液对照组的平均菌落数比值)应在 0.5~2 范围内。

表 5 样品 2 新方法验证结果(CFU/mL)  
Table 5 Sample 2 verification results (CFU/mL)

供试液对照组 A	①		②		平均		回收率/%	结论
	0		0		0			
菌种 项目	菌液组 A			实验组 A			回收率/%	结论
	①	②	平均	①	②	平均		
金黄色葡萄球菌	48	54	51	61	54	58	114	符合规定
大肠埃希菌	88	76	82	80	72	76	93	符合规定
枯草芽孢杆菌	42	47	44	44	52	48	107	符合规定
酿酒酵母	77	68	72	65	61	63	88	符合规定
黑曲霉	35	31	33	36	34	35	107	符合规定

注: 实验组的回收率(实验组的平均菌落数-供试液对照组的平均菌落与菌液对照组的平均菌落数比值)应在 0.5~2 范围内。

表 6 样品 3 新方法验证结果(CFU/mL)  
Table 6 Sample 3 verification results (CFU/mL)

供试液对照组 A	①		②		平均		回收率/%	结论
	0		0		0			
菌种 项目	菌液组 A			实验组 A			回收率/%	结论
	①	②	平均	①	②	平均		
金黄色葡萄球菌	48	54	51	60	52	56	110	符合规定
大肠埃希菌	88	76	82	91	86	88	107	符合规定
枯草芽孢杆菌	42	47	44	40	43	42	93	符合规定
酿酒酵母	77	68	72	66	70	68	94	符合规定
黑曲霉	35	31	33	38	38	38	115	符合规定

注: 实验组的回收率(实验组的平均菌落数-供试液对照组的平均菌落与菌液对照组的平均菌落数比值)应在 0.5~2 范围内。

## 4 结 论

B 族维生素泡腾片在进行微生物限度检查<sup>[14]</sup>时, 若直接采用国标法, 会出现假阴性的情况。用 pH7.0 的无菌氯

化钠蛋白胨缓冲液将样品稀释, 采用薄膜过滤法<sup>[15,16]</sup>, 可消除供试品的抑菌性, 3 次验证试验, 5 种菌的回收率均在 0.5~2 范围内。表明薄膜过滤法更适用 B 族维生素泡腾片的微生物限度检测。

## 参考文献

- [1] GB/T 4789.2-2016 食品安全国家标准 食品微生物学检验 菌落总数测定[S].  
GB/T 4789.2-2016 National food safety standard-Food microbiology inspection—Aerobic plate count [S].
- [2] 特玉香, 王文捷, 祈文娟, 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 hygienic microbiology test method of health food [J]. Chin Pharm Affairs, 2008, 22(7): 594-597.
- [3] 中国药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[Z].  
Chinese pharmacopoeia commission. Pharmacopoeia of the people's republic of China (part 1) [Z].
- [4] 周建新, 汪海峰, 姚明兰. 银杏叶提取物(EDb)抗菌特性的研究[J]. 食品科学, 2002, 23(9): 118-121.  
Zhou JX, Wang HF, Yao ML. Study on antibacterial properties of ginkgo biloba extract (EDb) [J]. Food Sci, 2002, 23(9): 118-121.
- [5] 郑磊, 崔慧斐. 壳聚糖抗微生物活性及其作用机制的研究近况[J]. 食品与药品, 2008, 10(11): 58-62.  
Zheng L, Cui HW. Recent research on the antimicrobial activity and mechanism of chitosan [J]. Food Drug, 2008, 10(11): 58-62.
- [6] 董勇. 薄膜过滤法在药品检验中的应用研究[J]. 临床合理用药杂志, 2018, (16): 555-556.  
Dong Y. Application of membrane filtration in drug testing [J]. Chin J Clin Rational Drug Use, 2018, (16): 555-556.
- [7] 胡利平, 王彤. 薄膜过滤法在药品检验中的应用[J]. 临床医药文献电子杂志, 2014, (2): 120-121.  
Hu LP, Wang T. Application of membrane filtration in drug testing [J]. J Clin Med Lit, 2014, (2): 120-121.
- [8] 中国药品生物制品检定所. 中国药品检验标准操作规范[M]. 北京: 中国医药科技出版社.  
China institute for drug and biological products. Chinese standard practice for drug inspection [M]. Beijing: China Medical Science Press.
- [9] 冯林慧, 李迎秋, 张鑫. 三种天然防腐剂对五种常见微生物抑菌作用的研究[J]. 中国调味品, 2019, 44(1)63-66.  
Feng LH, Li YJ, Zhang X. Study on the bacteriostatic effects of three natural preservatives on five common microorganisms [J]. Chin Condiment, 2019, 44(1): 63-66.
- [10] 姜拓昱, 仲晗实, 杨兆琪, 等. 常规食品防腐剂简析及一种新型抑菌机理的初步探索[J]. 中国科技论文, 2016, 11(12): 1414-1421.  
Jiang TY, Zhong HS, Yang ZQ, *et al.* A brief analysis of conventional food preservatives and a preliminary exploration of a new antibacterial mechanism [J]. Chin Sci Technol Papers, 2016, 11(12): 1414-1421.
- [11] 莫小林, 伍小燕, 韦振源, 等. 10 种中药制剂微生物限度检查方法学的验证[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 7(18): 56-59.  
Mo XL, Wu XY, Wei ZY, *et al.* Validation of microbial limit test methodology for ten kind of traditional Chinese medicine preparations [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2012, 7(18): 56-59.
- [12] 宋永熙, 刘世萍, 马妍妍, 等. 安神宁口服液微生物限度检查方法的研究[J]. 中国药学杂志, 2012, 47 (13): 1074 - 1076.  
Song YX, Liu SP, Ma YY, *et al.* Study on microbial limit test method of anshenning oral liquid [J]. Chin Pharm J, 2012, 47(13): 1074 - 1076.
- [13] 潘海虹, 徐有斌. 抑菌性药品的微生物检查与分析[J]. 化工管理, 2019, (32): 182-183.  
Pan HH, Xu YB. Microbiological examination and analysis of bacteriostatic drugs [J]. Chem Enterp Manage. 2019(32): 182-183.
- [14] 万进, 林蒙, 谢委, 等. 盐酸左氧氟沙星凝胶微生物限度检查方法验证[J]. 医药导报, 2015, 34(11): 1486-1489.  
Wan J, Lin M, Xie W, *et al.* Validation of microbial limit test method for levofloxacin hydrochloride gel [J]. Herald Med, 2015, 34(11): 1486-1489.
- [15] 徐丹. 论药品检验中薄膜过滤法的应用[J]. 中国药物经济学, 2013, (s1): 41-42.  
Xu D. The application of membrane filtration in drug testing [J]. Chin J Pharm Econ, 2013, (s1): 41-42.
- [16] 郭明义, 苏喜芝. 药品检验中薄膜过滤法的应用价值[J]. 中国继续医学教育, 2015, (12): 177-178.  
Ge MY, Su XZ. The application value of membrane filtration in drug testing was discussed [J]. Chin Contin Med Ed, 2015, (12): 177-178.

(责任编辑: 王 欣)

## 作者简介



刘长富, 主要研究方向为微生物质量检测。  
E-mail: 297116445@qq.com



蔡伟江, 工程师, 主要研究方向为食品质量与安全。  
E-mail: 714524253@qq.com