

直接落射荧光/平板计数法检测辐照中草药

张海滨*, 楼阁, 王妮辰, 张敏, 杨茜

(天津出入境检验检疫局动植物与食品检测中心, 天津 300461)

摘要: **目的** 建立一种适用于中草药辐照检测方法。**方法** 对白蔻、紫苏、忍冬藤、甘草与荷叶 5 种中草药样品分别在 4 kGy、5 kGy 及 10 kGy 剂量下进行辐照处理, 同时以未辐照样品作为对照。辐照后分别测试每份样品的直接落射荧光计数单位(DEFT 值)和细菌总数(APC 值), 并计算 DEFT 值与 APC 值之差(Dc 值), 将该差值与特定阈值比较判定样品辐照情况。**结果** 随辐照剂量增加, DEFT 值差异不显著, DEFT 值分别为 0 kGy: 6.9~9.0, 4 kGy: 6.8~8.7, 5 kGy: 6.7~8.9, 10 kGy: 6.9~9.0; APC 值逐渐降低, APC 值分别为 0 kGy: 6.0~7.8, 4 kGy: 3.8~5.6, 5 kGy: 3.2~5.5, 10 kGy: 1.2~3.7; 辐照后 4 组样品之间 Dc 值差异显著, 4 kGy、5 kGy、10 kGy 及 0 kGy 下辐照处理样品的 Dc 均值分别为 2.6~4.9, 3.0~5.3, 5.3~7.3 和 0.4~2.0。**结论** 当阈值设定为 3.0 时, 可检测出 5.0 kGy 及 5.0 kGy 以上辐照处理样品。

关键词: 辐照; 中草药; 直接荧光过滤; 平板计数

Identification of irradiation of herbal medicine by direct epifluorescent filter technique-aerobic plate count method

ZHANG Hai-Bin*, LOU Ge, WANG Wei-Chen, ZHANG Min, YANG Xi

(Animals, Plants and Foodstuffs Inspection Center, Tianjin Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Tianjin, 300461, China)

ABSTRACT: Objective To establish a screening method for detecting irradiation of herbal medicine in China. **Methods** Samples of 5 kinds of herbal medicine, including cardamon, purple perilla, honeysuckle stem, liquorice, and lotus leaf, were irradiated with the doses of 4 kGy, 5 kGy and 10 kGy, one group of unirradiated samples were kept as the 0 kGy. The direct epifluorescent filter technique count unit (DEFT value), aerobic plate count unit (APC value), the difference of DEFT and APC (DC value) were calculated after irradiation. Then the DC value was compared to a special threshold to determine the irradiation situation of the samples. **Results** The results indicated that with the irradiation dose increased, the difference of DEFT was not significant, the DEFT value was 0 kGy: 6.9~9.0, 4 kGy: 6.8~8.7, 5 kGy: 6.7~8.9, 10 kGy: 6.9~9.0; and the APC value was decreased, the APC value was 0 kGy: 6.0~7.8, 4 kGy: 3.8~5.6, 5 kGy: 3.2~5.5, 10 kGy: 1.2~3.7; the Dc values of the 4 groups were statistically significant, the Dc values of 4 kGy, 5 kGy, 10 kGy and 0 kGy was 2.6~4.9, 3.0~5.3, 5.3~7.3 and 0.4~2.0 respectively. **Conclusion** When 3.0 was set as the threshold, the samples irradiated with dose of 5 kGy and up could be identified.

基金项目: 质检公益性行业科研专项(200910142)

Fund: Supported by Commonweal Research Project of General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China (200910142)

*通讯作者: 张海滨, 高级工程师, 主要研究方向为微生物学、农产品品质检验及研究。E-mail: Zhanghb@tjciq.gov.cn

*Corresponding author: ZHANG Hai-Bin, Senior Engineer, Animals, Plants and Foodstuffs Inspection Center, Tianjin Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Tianjin 300461, China. E-mail: Zhanghb@tjciq.gov.cn

KEY WORDS: irradiation; herbal medicine; direct epifluorescent filter technique; aerobic plate count method

1 引言

中草药作为中医的基础,是几千年经验汇聚的精华。中草药是一种典型的“药食同源”食品,所涉及的药用植物据统计多达 7300 种,卫生部在《关于进一步规范保健食品原料管理的通知》公布了 87 种药食同源中草药。中草药(药食同源 - 食品)作为我国中医学千年文化的结晶,源远流长,与现代科学结合后,共同构成了我国特有的中国卫生医疗模式,在中华医疗保健领域发挥着愈来愈大的作用。中药产业也是我国在国际贸易中具有比较优势的产业之一,近几年一直处于增长态势。2010 年中药类商品贸易总额达到 20.46 亿美元,其中中药材占有较大比重^[1]。然而,由于中药行业总体技术装备水平落后,中药产品质量尚不够稳定,当今国际贸易环境下,日益严格的国际市场准入和贸易性技术壁垒等,都给我国中药企业的进一步发展提出了巨大的挑战^[2]。值得注意的是,欧美等国将中草药作为食品进行管理^[3],我国中药材的种植、加工工艺及储运等能否适应新的国际发展形势左右着整个产业的发展。

中草药(药食同源 - 食品)品种众多,加工工艺多种多样,呈现特有的复杂性。然而,在新的国际贸易形势下,以及中草药功能性需求的拓展使得中草药的卫生质量越发显得重要。目前国内采用的杀菌工艺一般为热加工、晾晒、熏蒸等,尽管能够满足品质要求,但在控制微生物污染方面仍不尽如人意,尤其是在后续环节尚存在交叉污染以及再次污染的风险。当前出口中草药贸易渠道受限,中草药安全更成为重要影响条件^[4]。自上世纪 70 年代,我国即开始了辐照处理中草药科学项目的研究,卫生部于 1997 年发布了国内流通中草药的辐照标准^[5]。辐照处理领域除了需要制定工艺规范和监管条例之外,还需要制定有效的辐照产品鉴定方法。截至 2004 年,CAC(Codex Alimentarius Commission)先后颁布了 10 项辐照食品鉴定方法标准共分为 8 种鉴定方法,成为各国辐照领域参考的重要依据^{[6][7]}。

本文对直接落射荧光技术结合需氧菌平板计数方法鉴定辐照中草药(药食同源食品)进行了研究^{[8][9]}。其原理是采用直接落射荧光计数测得样品中处

理前微生物总数,以需氧菌平板计数测得处理后尚存微生物数量,从二者之间的差值进行分析对样品是否经过辐照处理进行初筛判断。该方法不需要贵重的检测仪器,对实验室硬件要求不高;同时检测通量大,可同时检测多份样品;此外可在鉴定的同时实现微生物状况的监测,为辐照监管以及企业 HACCP 管理提供有效依据和手段^[10]。

2 材料与方法

2.1 样品

2.1.1 分析样品

自中药店及收购商渠道购买和搜集中草药样品。应确认样品未经任何杀菌处理。共计 5 种样品:白蔻(A)、紫苏(B)、忍冬藤(C)、甘草(D)与荷叶(E)。将每种样品无菌等分分装至无菌树脂袋内。于辐照中心以⁶⁰Co 源进行辐照处理。按照 0 kGy、4 kGy、5 kGy、10 kGy 平均分样,做好标记。辐照后进行直接落射荧光计数(DEFT)和需氧菌平板计数(APC)检测。

2.1.2 分析样品的制备

辐照剂量(吸收剂量):分别为 4 kGy、5 kGy、10 kGy,同时以未辐照样品作为对照,即 0 kGy。辐照源采用⁶⁰Co,将原始样品充分混匀,每份取 50 g 样品无菌分装至无菌封口透明树脂袋中,其外再以一透明树脂袋包装,作好标记,每个样品种类按照 5 份平行试验分装。送至辐照中心按照指定剂量进行辐照处理。

2.2 实验方法

2.2.1 方法原理

本方法是将由直接落射荧光过滤检测(DEFT)结果与平板计数法(APC)结果进行对比。APC 方法检测结果为辐照处理样品中残存活菌数,DEFT 结果为样品中活菌数及辐照处理后失活的细菌总数。将一定体积的样液通过滤膜减压过滤。以吖啶橙对截留在滤膜上的微生物进行荧光染色,在 450 nm 至 490 nm 蓝光下产生橙色至橙黄色荧光。APC 及 DEFT 结果之间差值与特定阈值比较,判断样品是否经过辐照处理,如差值大于该阈值为阳性,反之则为阴性。

2.2.2 仪器及试验器具

薄膜过滤器,抽滤瓶及抽滤漏斗,纤维素酯滤

膜(孔径 0.2 μm , 直径 47 mm), 聚丙烯滤膜(孔径 10 μm , 直径 25 mm), 白色聚碳酸酯滤膜(孔径 0.6 μm , 直径 25 mm), 无菌快速滤纸, 落射荧光显微镜, 载玻片和盖玻片, 其他微生物常规检测设备及器具。

2.2.3 试剂及培养基

8.5%生理盐水, 平板计数琼脂, 缓冲溶液(pH 3.0), 吡啶橙染色液, 2-丙醇, 所有试剂使用前须进行无菌过滤, 培养基应进行高压灭菌。

2.2.4 检测步骤

2.2.4.1 样品过滤

取 5 g 试样置于盛有 45 mL 灭菌蛋白胨盐水稀释液的锥形瓶中, 剧烈摇动锥形瓶约 30 s。将样液通过无菌快速滤纸过滤。倍比稀释后进行 DEFT 检测及 APC 检测。以预热至 80 $^{\circ}\text{C}$ 过滤除菌的 1% Triton X-100 过滤清洗薄膜过滤器三次, 再用沸水清洗过滤塔三次。将 0.6 μm 聚碳酸酯膜光面朝上放置在薄膜过滤器中然后在其上放置 10 μm 孔径的聚丙烯滤膜。将 2 mL 样液经过滤器过滤。在真空泵运行状态下将放置在白色聚碳酸酯膜上的 10 μm 孔径的聚丙烯滤膜移去。取 2 mL 无菌生理盐水按照上述操作进行作为空白对照。过滤不同样品前须用沸水过滤清洗滤筒三次。

2.2.4.2 染色和制备 DEFT 玻片

关闭真空泵, 在滤塔内加入 2.5 mL 吡啶橙溶液, 2 min 后开启真空泵吸去吡啶橙溶液。保持连接真空泵运行并迅速用 2.5 mL pH3.0 缓冲液清洗滤膜。最后用 2.5 mL 2-丙醇快速过滤清洗滤膜。关闭真空泵, 用镊子将聚碳酸酯膜夹起晾干。在载玻片中心滴一滴浸镜油, 将滤膜光面朝上放置在油滴中心。在滤膜中心再滴一滴浸镜油。将盖玻片放置于上方, 轻轻地向下挤压盖玻片减少油层厚度。

2.2.4.3 平板计数(APC)

过滤和稀释样品后 15 min 内按照 GB4789.2 进行 APC 检测。在无菌培养皿中加入 1 mL 适当稀释度的样液然后加入大约 15 mL 平板计数琼脂(预先冷却至 47 $^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$)混匀。待琼脂凝固后将其倒置于 30 $^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 的培养箱内培养 72 h。

2.2.4.4 DEFT 计数

将 DEFT 片放入落射荧光显微镜下观察, 对可见的 DEFT 单位进行计数, 在盖玻片上滴一滴浸镜油, 置于荧光显微镜下, 用 100 \times oil 物镜观察, 在随机选择的显微视野下, 计数发黄色和橙黄色荧光的微生物

物 DEFT 计数单位。

2.2.4.5 计算结果

计算 DEFT 数, 见公式(1)和(2)

$$x = \frac{N}{n} \cdot M \cdot D \quad (1)$$

$$M = \frac{F}{A \cdot V} \quad (2)$$

式中: x - 每克样品中 DEFT 单位数; N - DEFT 单位的总和; n - 计数的显微视野数; M - 显微镜系数; D - 样品稀释因子 (例如 5 g 样品 + 45 mL 蛋白胨盐水稀释液=10 mL/g); F - 有效过滤面积, mm^2 , 可测量过滤塔底部的直径(r_1 =半径)计算得出; A - 显微视野面积, mm^2 , 可使用镜台测微计(最大量程 0.01 mm)测量显微视野的直径(r_2 =半径)计算得出; V - 样品体积, mL; 每克样品中的 DEFT 数及其对数形式保留两位有效数字。

计算 APC。依据 GB 4789.2 的计算方法, 培养后的培养皿可进行需氧微生物计数(APC 计数)。依据样液体积和稀释因子对每克样品中所含的微生物计数, 数值可用菌落形成单位(CFU)来表述。APC 数保留两位有效数字, 转成对数后也保留两位有效数字。

计算 DEFT 与 APC 差值。DEFT 数和 APC 数分别取对数, 求得差值(Dc)。见公式(3)。

$$Dc = A - B \quad (3)$$

3 结果

检测结果详见图 1~图 3。白蔻(A)、紫苏(B)、豆蔻(C)、甘草(D)与荷叶(E)样品经 0 kGy、4 kGy、5 kGy 和 10 kGy 辐照处理后, DEFT 值分别为 0 kGy:6.9~9.0, 4 kGy:6.8~8.7, 5 kGy:6.7~8.9, 10 kGy:6.9~9.0。APC 值分别为 0 kGy:6.0~7.8, 4 kGy:3.8~5.6, 5 kGy:3.2~5.5, 10 kGy:1.2~3.7。Dc 值分别为 0 kGy:0.4~2.0, 4 kGy:2.6~4.9, 5 kGy:3.0~5.3, 10 kGy:5.3~7.3, 各剂量 Dc 值差异显著($P < 0.001$)。

4 讨论

如图 1 和图 2 所示, 样品 A~E 在各辐照剂量下的 DEFT 值随辐照剂量增加没有明显变化, 而 APC 值则呈下降趋势。吡啶橙(AO)染色是根据其对细胞和病原微生物中的两种核酸(DNA 和 RNA)有高度的分色能力, 经吡啶橙染色后 DNA 呈黄绿色荧光, RNA 呈黄色~橙黄色荧光^[11]。DNA 存在与细胞核内,

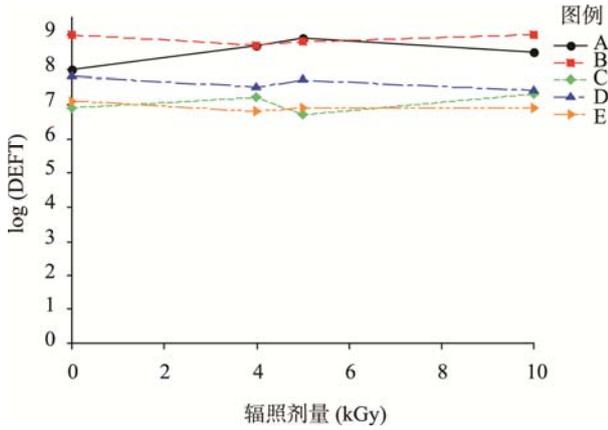


图 1 样品 A-E 不同辐照剂量下 DEFT 值
Fig. 1 DEFT values of sample A-E

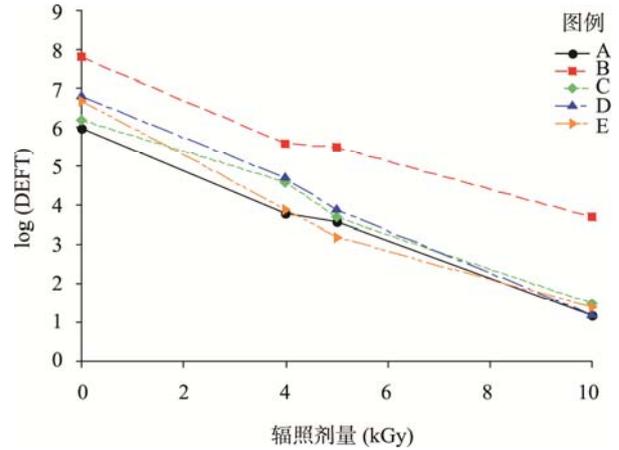


图 2 样品 A-E 不同辐照剂量下 APC 值
Fig. 2 APC values of sample A-E

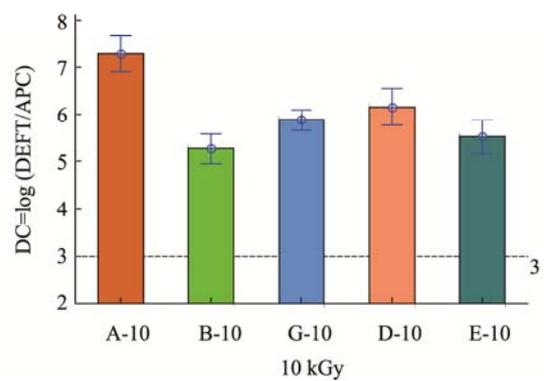
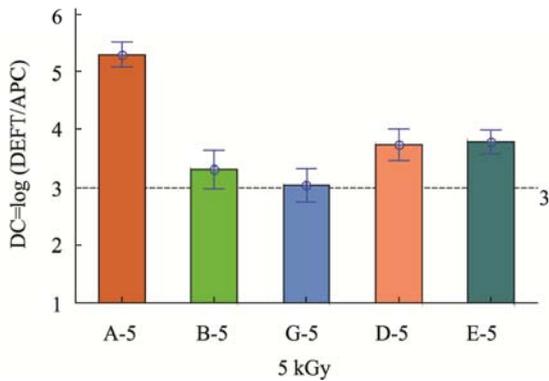
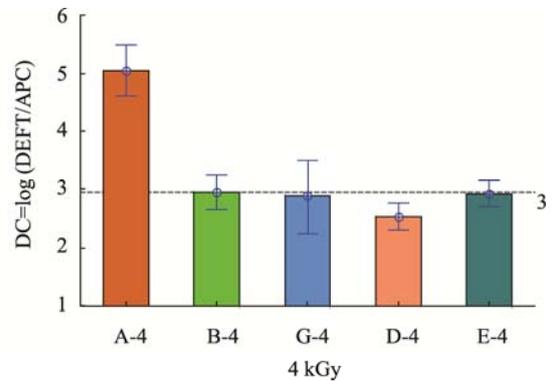
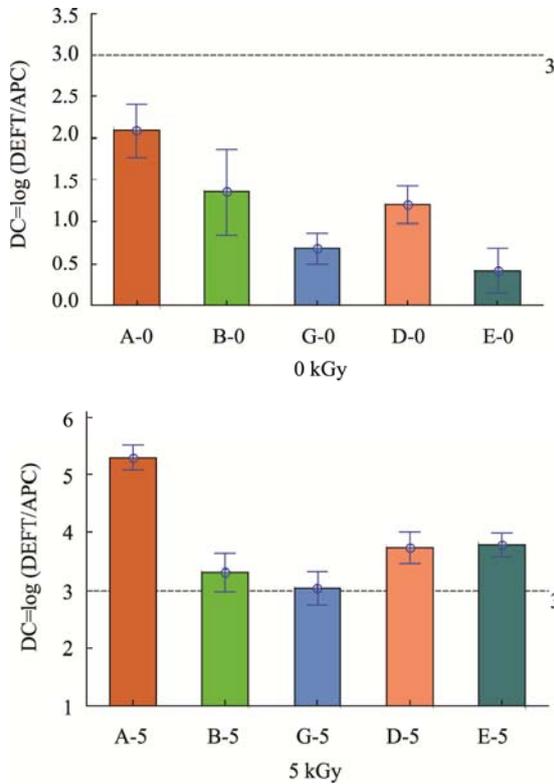


图 3 0 kGy、4 kGy、5 kGy 和 10 kGy 辐照处理后样品 A~E 的 Dc 值分布
Fig. 3 DC values of sample A-E after radiation under 0 kGy, 4 kGy, 5 kGy, 10 kGy

RNA 分布于核仁和细胞质内, 当细胞中核质由于细胞死亡丢失则会使其呈现绿色荧光^[12]。而辐照处理致使细胞 DNA 畸变失去遗传性且不能修复失去活性, 并不破坏细胞外层结构, 因此辐照致死的微生物细胞在 AO 染色后仍能呈现黄色至橙黄色, 处理前已死亡细胞则呈现绿色, 从而在 DEFT 计数得出的是辐照

处理后死亡及成活细胞的总数, 出现上述 DEFT 结果不随辐照剂量增加而发生变化。

如图 3 所示, 样品 A~E 0 kGy 剂量处理后, Dc 平均值 0 kGy 为 0.4~2.0, 4 kGy 下为 2.6~4.9, 5 kGy 辐照后为 3.0~5.3, 10 kGy 差值最大, 为 5.3~7.3。如设定判定阈值 2.0, 可检测出 4 kGy 及以上辐照样品, 但

会有一定的假阳性几率;如设定阈值 3.0,可检测出所有 5 kGy 及以上辐照样品,无假阳性结果,因此对本文研究的 5 种中草药样品,可应用本文所述方法进行辐照初筛鉴定。

5 结 论

直接荧光滤膜/平板计数法初筛鉴定法可用于辐照中草药(药食同源食品)的检测,对于本文研究的白蔻、紫苏、豆蔻、甘草与荷叶可应用该方法进行辐照初筛检测。经实验验证,当阈值设定为 3.0 时,可检测经 5 kGy 及以上剂量辐照的上述中草药样品。国外学者对该方法在辐照中草药鉴定进行了研究,Oh 等^[13]研究了辐照黄芷、甘草、香樟 DEFT/APC 鉴定方法的应用。该方法除可应用于中草药的辐照鉴定,还可以同时进行辐照产品卫生指标的监控,其具有操作简便、硬件要求不高和实现多样品同时检测的特点,除了本文涉及的样品基质种类,其他如香辛料、乳制品、水产品、冷冻肉制品等也可应用本方法进行有效鉴别^[11,14,15,16]。

参考文献

- [1] 宋英杰,徐怀伏.我国中药产品对外贸易现状分析[J].现代商贸工业,2011,(1):99-100.
Song YJ, Xu HF. Foreign trade analysis of herbal in China [J]. Mod Bus Trade Ind, 2011(1): 99-100.
- [2] 张晓东. 中药出口面临的贸易壁垒及对策[J]. 中国国情国力, 2011, (11): 38-41.
Zhang XD. Trade barriers faced by Chinese herbal export [J]. China Nat Condit Strength, 2011, (11): 38-41.
- [3] 高佳,杜仲燕,李东成,等. 中医药在美国的生存概况分析[J]. 药物生物技术, 2013, 20(2): 186-188.
Gao J, Du ZY, Li DC, et al. Traditional Chinese medicine situation in America [J]. Pharmaceut Biotechnol, 2013, 20(2): 186-188.
- [4] 李刚. 我国中药出口贸易现状与对策研究[J]. 中国医药信息杂志, 2005, 12(2): 2.
Li G. The research on Chinese foreign trade situation and countermeasure in herbal [J]. Chin J Inform TCM, 2005, 12(2): 2.
- [5] 张立雯,江英桥,林彤,等. 中药辐照检测研究现状概述[J]. 中药材, 2011, 34(3): 482.
Zhang LW, Jiang YQ, Lin T, et al. The summarization on herbal irradiation identification research status [J]. J Chin Med Mater, 2011, 34(3): 482.
- [6] 汪勋清,哈益明,高美须. 食品辐照加工技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 4-8.
Wang XQ, Ha YM, Gao MX. The Irradiation Processing Technique in Food Industry [M]. Beijing: Chemical Industry Publishing House, 2005: 4-8.
- [7] 郭桂萍,高洁湘,王匀,等. 辐照食品检测鉴定方法[J]. 中国食物与营养, 2010, (3): 10-13.
Guo GP, Gao JX, Wang Y, et al. The food irradiation identification method [J]. China Food Nutrit, 2010, (3): 10-13.
- [8] 郑文杰. 辐照食品鉴别技术现状及研究进展[J]. 检验检疫学报, 2013, 23(5): 1-6.
Zheng WJ. Research Progress and Status of Irradiated Food Identification Technology [J]. J Inspect Quarant, 2013, 23(5): 1-6.
- [9] 赵永富,李俐俐,王志东,等. 直接荧光技术/平板计数法(DEFT/APC)检测辐照食品[J]. 核农学报, 2010, 24(5): 1006-1010.
Zhao YF, Li LL, Wang ZD, et al. Detection of irradiated food by using direct epifluorescent filter technique /aerobic plate count method(DEFT /APC)[J]. J Nuclear Agric Sci, 2010, 24(5): 1006-1010.
- [10] Wirtanen G, Sjoberg AM, Boisen F, et al. Microbiological screening method for indication of irradiation of spices and herbs: A BCR collaborative study [J]. J AOAC Int, 1993, 76(3): 674-681.
- [11] Boisen F, Skovgaard N, Ewald S, et al. Quantitation of microorganisms in raw minced meat using the direct epifluorescent filter technique: NMKL collaborative study [J]. Microbiol Meth, 1992, 75(3): 465-472.
- [12] 董学武,王强,李潮,等. 用吖啶橙荧光染色对喉癌细胞 DNA 和 RNA 的观察[J]. 中国耳鼻喉科杂志, 1993, 28(6): 360.
Dong XW, Wang Q, Li C, et al. The observation of DNA and RNA of laryngocarcinoma cell by stain of acridine orange [J]. Chin J Otorhinolaryngol, 1993, 28(6): 360.
- [13] Oh KN, Lee HJ, Yang S, et al. Screening of gamma-irradiated medicinal herbs by using a microbiological method(DEFT/APC) [J]. Food Sci Biotechnol, 2002, 11(5): 507-510.
- [14] Copln MM, Jehanno D, Bourgeois CM. Detection of irradiated deep1-Mfrozen foodstuffs by comparison of DEFT and APC counts [J]. J Appl Bacteriol, 1993, 75: 254-258.
- [15] Betts RP, Farr L, Bankes MF. The detection of irradiated foods using the direct epifluorescent filter technique [J]. J Appl Bacteriol, 1988, 64: 329-335.

- [16] Araujo MM, Duarte RC, Silva PV, *et al.* Villavicencio. Application of the microbiological method DEFT/APC to detect minimally processed vegetables treated with gamma radiation [J]. Radiat Phys Chem, 2009, 78: 691–693.

(责任编辑: 白洪健)

作者简介



张海滨, 高级工程师, 主要研究方向为微生物学、农产品品质检验及研究。
E-mail: Zhanghb@tjciq.gov.cn

“现代发酵工程在食品工业中的应用”专题征稿

目前, 生物工程技术已经被人们广泛的应用在人类社会发展的过程中, 不仅给生活和工程带来了极大的便利, 同时因其具有环境保护作用, 给人们带来广阔的经济效益和良好的社会效应。发酵工程是生物技术产业化的基础, 而在食品领域发展的过程中, 现代发酵工程技术也成为其中的主要内容。

鉴于此, 本刊特别策划了“**现代发酵工程在食品工业中的应用**”专题, 由河南工业大学的**黄继红教授**担任专题主编。黄继红教授兼任中国发酵工程研究会专家组专家, 中国微生物学会理事, 河南省食品科学技术学会常务理事, 河南省生物工程学会副理事长, 河南省微生物学会理事, 国家级节能减排评估师, 国家食品生产质量安全评估师。长期从事现代发酵工程的研究。本专题主要围绕: **改造传统的食品加工工艺, 开发功能性食品, 新糖原的开发, 微生物蛋白及生物活性小分子肽的生产, 微生物油脂的生产, 发酵饮料、酒类的生产, 微生物发酵生产食品添加剂**等内容进行论述, 或您认为本领域有意义的问题展开讨论, 计划在**2015年4月**出版。

本刊编辑部及**黄继红教授**特邀请各位专家为本专题撰写稿件, 以期进一步提升该专题的学术质量和影响力。综述、实验报告、研究论文均可, 请在**2015年3月10日**前通过网站在线投稿或 E-mail 投稿。我们将快速处理并优先发表。也可加急, 投稿时请注明!

投稿方式:

网站: www.chinafoodj.com

E-mail: tougao@chinafoodj.com

《食品安全质量检测学报》编辑部