

广陈皮药材及饮片微生物限度检验方法 建立及污染情况调查分析

陈立豪 方 慧 雷铭豪

江门市药品检验所 广东江门 529000

摘 要: 药材及饮片微生物的大量繁殖, 影响到药材及饮片质量和安全性。本文通过广陈皮微生物限度方法适用性试验, 建立广陈皮的微生物检验方法; 对 19 批来源不同的广陈皮药材及饮片微生物污染情况进行调查, 探索广陈皮微生物污染控制的方法。

关键词: 广陈皮; 微生物限度方法适用性试验; 微生物污染控制

陈皮为芸香科植物橘 (*Citrus reticulata* Blanco) 及其栽培变种的干燥成熟果皮, 具理气健脾, 燥湿化痰之功能^[1]。陈皮因产地和栽培品种的不同分为陈皮和广陈皮, 而广陈皮实指是新会地区所产的陈皮最为正宗, 即新会陈皮。研究表明, 新会陈皮富含多糖、挥发油和黄酮类等多种有效成分^[2]。

由于广陈皮在种植、加工和自然陈化过程中, 极易受微生物污染, 在合适的条件下微生物会大量繁殖, 常导致果皮发霉, 影响药材及饮片质量和安全性。而防止中药饮片在贮存、运输过程中污染微生物的增殖更为重要^[3]。目前中药控制微生物污染的传统手段包括高低温烘烤、辐照灭菌, 使用防腐剂等, 但这些方法都存在一定的限制, 容易破坏中药的有效成分, 辐照可能产生的残留物及防腐剂还可能影响药物的安全性。另有报道陈化过程中微生物对陈皮有效成分转化有重要影响^[4]。陈化过程需要微生物的参与, 因此, 广陈皮作为农副产品, 自然陈化需要有益微生物的参与, 不能通过常规灭菌工艺加以控制, 宜采取控制繁殖而不是彻底消灭方式。

本文研究对象包括了原药材及饮片, 并依照药品微生物限度所有的检查项检查, 以获得准确全面的微生物污染情况。另通过对广陈皮药材及饮片微生物污染情况和其储存条件及年份关系研究分析, 旨在获取科学的仓储条件及了解储存年份对微生物的影响, 探究控制仓储条件及年份在广陈皮陈化中的应用, 建立一种安全、有效的微生物污染控制方法。

(1) 仪器

电热恒温培养箱 HPX-9162MBE; 恒温恒湿培养箱 BSC-250; 压力蒸汽灭菌器 MLS-831L; 热空气消毒箱 GR-246; 气浴恒温振荡器 ZD-85; 生物安全柜 BSC-

1300 II A2; 电子天平 JJ500; 红外接种环灭菌器 HKM-9802A; 全自动药敏及鉴定分析系统 ARIS 2X

(2) 菌种

铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) [CMCC(B)10104] 2a18 (来源: 中检院); 金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) [CMCC(B)26003] 5a27 (来源: 中检院); 枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) [CMCC(B)63501] 2a20 (来源: 中检院); 白色念珠菌 (*Candida albicans*) [CMCC(F)98001] 2a13 (来源: 中检院); 黑曲霉 (*Aspergillus niger*) [CMCC(F)98003] 240923M2 (来源: 杭州标迈生物技术有限公司); 大肠埃希菌 (*Escherichia coli*) [CMCC(B)44102] 3a23-1 (来源: 中检院); 乙型副伤寒沙门菌 (*Salmonella paratyphi B*) [CMCC(B)50094] 2a6 (来源: 中检院)

(3) 培养基

表 1 培养基

培养基名称	来源公司	批号
胰酪大豆胨液体培养基	广东环凯微生物科技有限公司	240410K10
胰酪大豆胨琼脂培养基	广东环凯微生物科技有限公司	240428K10
沙氏葡萄糖琼脂培养基	广东环凯微生物科技有限公司	240423K10
麦康凯液体培养基	广东环凯微生物科技有限公司	230317K10
麦康凯琼脂培养基	广东环凯微生物科技有限公司	221116010
pH7.0 氯化钠-蛋白胨缓冲液	广东环凯微生物科技有限公司	230920A10
肠道菌增菌液体培养基	北京三药科技开发公司	2308252
RV 沙门增菌液体培养基	广东环凯微生物科技有限公司	230923K10
木糖赖氨酸脱氧胆酸盐琼脂培养基	广东环凯微生物科技有限公司	1113695
紫红胆盐葡萄糖琼脂培养基	广东环凯微生物科技有限公司	230113010
溴化十六烷基三甲胺琼脂培养基	广东环凯微生物科技有限公司	240613K10
甘露醇氯化钠琼脂培养基	广东环凯微生物科技有限公司	240122K10

(4) 样品采集

表 2 样品信息

序号	样品	来源	年份	生产批号	包装
1	新会陈皮	广东泰升药业有限公司	3	23100060	铁罐
2	新会陈皮	广东泰升药业有限公司	5	24040030	铁罐
3	新会陈皮	新会天马	3	/	散装
4	新会陈皮	新会天马	5	/	散装
5	新会陈皮	新会三江	3	/	散装
6	新会陈皮	新会三江	5	/	散装
7	新会陈皮	新会双水	3	/	散装
8	新会陈皮	新会双水	5	/	散装
9	新会陈皮	新会司前	3	/	散装
10	新会陈皮	新会司前	5	/	散装
11	新会陈皮	药店 1（广州市怡康泰药业有限公司）	/	C240501	分装
12	新会陈皮	药店 2（广东华韩药业有限公司）	/	240301	罐装
13	新会陈皮	药店 3（广东汇康元药业有限公司）	/	231201	罐装
14	广西茶枝柑	广西平南市新镇安福村水田	1	1 号	散装
15	广西茶枝柑	广西钦州市浦北县木叶定村山坡	1	4 号	散装
16	广西茶枝柑	广西平南市新镇安福村水田	3	1 号	散装
17	广西茶枝柑	广西钦州市浦北县木叶定村山坡	3	4 号	散装
18	广西茶枝柑	广西平南市新镇安福村水田	5	1 号	散装
19	广西茶枝柑	广西钦州市浦北县木叶定村山坡	5	4 号	散装

1. 试验方法与结果

1.2.1 微生物计数

1.1 方法适用性试验

根据中国药典 2020 版四部 1105、1106 采用常规平皿法进行计数法的适用性试验和常规法进行控制菌的适用性试验。为全面调查药材及饮片污染的情况，耐胆盐革兰阴性菌只做定性检查，试验把金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌也列入考察范围。

取均匀样品 25g，加入 PH7.0 无菌氯化钠－蛋白胨缓冲液至 250ml，振荡约 15 分钟，取其清液为 1：10 供试液。取 1：10 供试液及连续 3 个 10 倍稀释级，分别注入温度不超过 45℃熔化的胰酪大豆胨琼脂培养基 15～20ml，混匀，凝固，倒置于 30～35℃，培养 3 天（每稀释级平行制备 2 皿），观察并计数测定需氧菌总数；取 1：10 供试液及连续 2 个 10 倍稀释级以注入温度不超过 45℃熔化的沙氏葡萄糖琼脂培养基 15～20ml，混匀，凝固，倒置于 20～25℃，培养 5 天（每稀释级平行制备 2 皿），观察并计数测定霉菌和酵母菌数。取 1：10 供试液经沸水浴 30 分钟处理后按上述需氧菌总数方法测定耐热菌总数。

1.1.1 结果判断

①计数法：通过 3 个不同批次的广陈皮计算各菌株的回收率，各菌株的回收率均达到药典要求的比值 0.5~2.0 的范围内。方法适用性试验通过，可以采用常规平皿法进行需氧菌、霉菌和酵母菌计数。

1.2.2 控制菌检查法

②控制菌：通过 3 个不同批次的广陈皮实验得出，当耐胆盐革兰阴性菌检测采用 10ml 肠道菌增菌液体培养基，大肠埃希菌、沙门菌、金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌均采用 100mlTSB 作为增菌培养液时，控制菌的适用性试验方法均通过，可使用常规法检测广陈皮的微生物限度控制菌检查项目。

取制备 1:10 供试液，接种至相应的培养基中摇匀培养。按各控制菌检测方法再接种至规定培养基中培养鉴定。

1.2.3 中药饮片陈皮微生物污染检测结果（cfu/g）

①微生物计数

1.2 广陈皮微生物污染情况调查

表 3 广陈皮微生物计数污染情况

序号	需氧菌总数 (cfu/g)	霉菌总数 (cfu/g)	耐热菌总数 (cfu/g)	大肠埃希菌	耐胆盐革兰阴性菌	沙门菌	金黄色葡萄球菌	铜绿假单胞菌
1	5	5	0	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出
2	0	25	0	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出
3	110	60	0	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出
4	240	75	0	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出

5	160	60	0	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出
6	130	30	0	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出
7	20	0	0	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出
8	520	310	0	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出
9	370	55	0	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出
10	10	15	0	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出
11	0	15	0	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出
12	130	35	0	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出
13	15	10	0	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出
14	30	0	0	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出
15	110	40	0	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出
16	20	10	0	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出
17	230	10	0	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出
18	380	270	0	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出
19	35	45	0	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出

从 19 批样品试验结果分析可以得出以下一些结论：微生物计数方面，需氧菌、霉菌和酵母菌污染率都极高，均达到 89%；控制菌方面，耐胆盐革兰阴性菌、大肠埃希菌、沙门菌、金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌均未检出。

2. 讨论与结论

2.1 广陈皮微生物限度方法学试验结果讨论

从广陈皮微生物限度方法学试验结果可知：微生物计数可以采用常规平皿法进行需氧菌、霉菌和酵母菌计数；而控制菌检查项目，可使用常规法检测。从而可知，广陈皮本身并无较强的抑菌能力，加上本身含糖量较大，容易污染真菌。因此，更需通过外部条件来控制微生物污染。

2.2 广陈皮微生物污染调查结果讨论

19 批广陈皮微生物污染调查试验结果：微生物计数方面，需氧菌、霉菌和酵母菌污染率都极高，均达到 89%，而耐热菌没有检出，可见沸水浴 30 分钟可以杀灭广陈皮中微生物；控制菌方面，耐胆盐革兰阴性菌、大肠埃希菌、沙门菌、金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌均未检出。本次试验 19 批广陈皮微生物污染情况尚在合格范围，可能是因为采收、加工和贮藏过程中，经常晾晒有关，太阳光具有强烈的紫外线，可以杀灭部分的细菌，通过晾晒，干燥的环境也不适宜细菌的繁殖。

3. 思考与建议

从本次广陈皮微生物污染调查结果来看，年份对于广陈皮的微生物污染情况未见显著的影响，可能和采集的样品年份区别不大有关。对于广陈皮微生物污染的控制，可从源头上来控制。在广陈皮的采收、加工、贮藏和运输过程中，尽量避免裸手接触，最好有固定的离地晾晒场地或设施，最

好采用阳光大棚。而不是采用民间传统的路晒方式。贮藏仓库需要注意防虫和通风。另外，广陈皮的陈化仓库需要维持一定的湿度。广陈皮质地变化与仓储库的温湿度参数密切相关，从温度影响来看，相比于 25~30℃ 下，随着温度升高，黄酮类化合物与挥发油含量均显著下降，甚至出现烧皮、少量挥发性成分损耗过大的现象；从湿度影响来看，相对湿度保持在 65% 左右是较理想的环境，湿度过低时广陈皮易产生断裂、陈化较慢，湿度过高时广陈皮较易蛀虫发霉^[5]。我们应该注意控制贮藏的湿度，使既能有利于陈皮的陈化，又能防止微生物过度生长。

参考文献：

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 [M]. 一部. 北京：中国医药科技出版社，2020:199-120.
- [2] 徐健，曾万祥，王晓东，等. 陈皮的化学成分与药理学作用研究进展 [J]. 中国野生植物资源，2022，41（10）：72-76+106.
- [3] 胡昌勤. 药品微生物控制现状与展望 [J]. 中国药学杂志，2015，50（20）：1747-1751.
- [4] 代琪，罗文凯，叶俏波，等. 微生物作用下陈皮陈化前后化学成分及药理作用研究进展 [J]. 亚太传统医药，2024，20（10）：250-255.
- [5] 闫国琦，屈佳蕾，欧国良，等. 广陈皮干燥和仓储技术及装备的现状与对策 [J]. 南方农业学报 2021，52（9）：2543-2553.

作者简介：陈立豪（1980—），男，汉族，广东台山市，主管药师，大学本科，研究方向为微生物。