

· 检验检测 ·

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2019.21.008

药品辅料蜂蜜的微生物检查方法研究*

周志云¹, 由亚宁¹, 马鹏飞¹, 吴 晗², 赵 冉³

(1. 陕西省食品药品监督检验研究院, 陕西 西安 710061; 2. 西安京西双鹤药业有限公司, 陕西 西安 710061;
3. 陕西中医药大学, 陕西 咸阳 712046)

摘要:目的 探讨不同含糖浓度的蜂蜜对微生物生长的影响。方法 取市售3种国产蜂蜜(槐花蜜、枣花蜜、椴树蜜),按2015年版《中国药典(四部)》非无菌产品微生物限度检查法规定,将3个品种蜂蜜与胰酪大豆胨液体培养基(TSB)混合后,分别得到10%~60%(大致含糖分数)的含糖浓度的供试液,取不加蜂蜜的TSB作为对照,同时做6种含糖浓度蜂蜜与TSB的无菌检查。另取6种浓度蜂蜜与5株标准菌株(金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、枯草芽孢杆菌、白色念珠菌、黑曲霉)混合,后进行方法学试验。结果 5株标准菌株的回收率均随着含糖浓度的升高而降低。结论 蜂蜜的含糖浓度对金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、枯草芽孢杆菌、白色念珠菌、黑曲霉的生长均有不同程度的抑制作用。

关键词:蜂蜜;含糖浓度;回收率;微生物检查方法;抗菌作用

中图分类号:R932;R284.1;R286.0

文献标识码:A

文章编号:1006-4931(2019)21-0029-04

Microbiological Inspection Method of Honey in Pharmaceutical Accessories

ZHOU Zhiyun¹, YOU Yaning¹, MA Pengfei¹, WU Han², ZHAO Ran³

(1. Shaanxi Institute for Food and Drug Control, Xi'an, Shaanxi, China 710061; 2. Xi'an Jingxi Shuanghe Pharmaceutical Co., Ltd., Xi'an, Shaanxi, China 710061; 3. Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang, Shaanxi, China 712046)

Abstract: **Objective** To investigate the effect of honey with different concentrations on the growth of microorganisms. **Methods** Three kinds of domestic honey(scented honey, jujube honey and eucalyptus honey) from the market were taken. According to the microbiological limit inspection method of non-sterile products of the *Chinese Pharmacopoeia*(volume IV, 2015 edition), three kinds of honey were mixed with tryptic soy broth(TSB) to obtain the test solution with sugar concentration of 10% - 60% (approximately sugar concentration). The TSB without honey was taken as the control, and the sterility test of six concentrations of honey and TSB were carried out at the same time. Besides, six concentrations of honey were mixed with five standard strains(*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans* and *Aspergillus niger*) for the methodological test. **Results** The recovery rates of five standard strains decreased with the increase of sugar concentration. **Conclusion** The sugar concentrations of the honey have different inhibitory effects on the growth of *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans* and *Aspergillus niger*.

Key words: honey; sugar concentration; recovery rate; microbiological inspection; antibacterial effect

蜂蜜是天然的防腐剂、黏合剂^[1-3],具有较高营养价值和功效^[4-5]。明代李时珍《本草纲目》云:“蜂蜜,其入药之功有五:清热也,补中也,解毒也,润燥也,止痛也”^[6]。其作为中药辅料使用在我国历史悠久。本研究中参照2015年版《中国药典(四部)》非无菌产品微生物限度检查法^[7-8],用5种微生物代表菌株,加入不同含糖浓度的蜂蜜中,采用平皿法试验,确定其抑菌性与含糖浓度的关系。现报道如下。

1 仪器与材料

1.1 仪器

HFsafe-1200 LC型生物安全柜(上海力申科学仪器有限公司);BS2202S型电子分析天平(德国赛多利斯公司);SHA-C型水浴恒温振荡器(天津鑫博得仪器有限公司);LRH-250B型生化培养箱(上海一恒科学仪器有限公司);霉菌培养箱(重庆四达实验仪器厂);

VITEK2型全自动微生物鉴定系统(法国梅里埃有限公司);CH型三目显微镜(日本奥林巴斯公司)。

1.2 菌种

金黄色葡萄球菌[CMCC(B)26003]、铜绿假单胞菌[CMCC(B)10104]、枯草芽孢杆菌[CMCC(B)63501]、白色念珠菌[CMCC(F)98001]和黑曲霉[CMCC(F)98003]均源于中国医学细菌保藏管理中心,工作菌株为第2代。

1.3 培养基

胰酪大豆胨琼脂培养基(TSA,批号为170325),沙氏葡萄糖琼脂培养基(SDA,批号为170316),胰酪大豆胨液体培养基(TSB,批号为170329),沙氏葡萄糖液体培养基(SDB,批号为160316),均购自北京陆桥技术有限责任公司。

1.4 供试品

槐花蜜(批号为20171108,玻璃瓶装,陕西春秋食

*基金项目:陕西省社会发展科技攻关项目[2015SF274]。

第一作者:周志云,女,大学本科,主管药师,研究方向为食品药品与化妆品微生物检测,(电子信箱)1271413243@qq.com。

品有限公司);枣花蜜(批号为 20171206,玻璃瓶装,陕西秦岭蜂业有限公司);秦岭紫椴雪蜜(批号为 20180428,玻璃瓶装,陕西春秋食品有限公司)。

2 方法与结果

2.1 试验菌种鉴定

按照 VITEK2 型全自动微生物鉴定系统操作规范,将 5 种试验菌株分别进行增菌、分离、纯化,并进行革兰染色、镜检。以无菌方式挑取分纯菌落置 3 mL 0.45% NaCl 试管中,采用比浊仪调整菌液浓度至规定菌悬液浓度。根据各个菌株革兰染色结果选定相应鉴定卡片,按顺序放在载卡架上,输样管插入菌液管中。将载卡架放入仪器的填充仓,关闭仓门,进行鉴定培养。结果显示,均检出标准菌株。

2.2 试验菌液制备

将金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、枯草芽孢杆菌分别接种于 TSB 中,35℃ 培养 24 h;将白色念珠菌接种于 SDB 中,25℃ 培养 3 d;将黑曲霉接种于 SDA 中,25℃ 培养 7 d,加入 5 mL 含 0.05% 聚山梨酯 80 的 0.9% 氯化钠溶液,洗脱孢子,收集孢子悬液,用含 0.05% 聚山梨酯 80 的 0.9% 氯化钠溶液制成适宜浓度的孢子悬液。采用 10 倍稀释法将金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、枯草芽孢杆菌、白色念珠菌和黑曲霉分别稀释至含菌量为 10^4 cfu/mL 的试验菌液。

2.3 培养基适用性检查

取不大于 100 cfu 的标准菌株金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、枯草芽孢杆菌、白色念珠菌和黑曲霉,分别接入测试与对照培养基,经规定温度、时间培养,测试结果与对照培养基平均菌落数的比值应为 0.5~2.0,且菌落形态、大小应与对照培养基上的菌落一致;被检液体培养基管与对照培养基管比较,试验菌生长良好。培养基适用性检查符合 2015 年版《中国药典(四部)》附录检查方法。

2.4 平皿法验证试验

供试液制备:取 3 个品种的蜂蜜(槐花蜜、枣花蜜、椴树蜜)各 15,25,40,55,70,80 mL,分别加 TSB 至 100 mL。45℃ 恒温振荡 15 min 使其溶解均匀,制成 6 种含糖浓度分别为 11.25%,18.75%,30.00%,41.25%,52.50%,60.00% 的供试液。

试验组溶液制备:取 3 个品种蜂蜜的 6 种不同含糖浓度的供试液,各分装于 5 个无菌试管中,每管装量为 9.9 mL,再分别加入含菌量不大于 10^4 cfu/mL 的金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、枯草芽孢杆菌、白色念珠菌、黑曲霉 5 种试验菌液各 0.1 mL。

菌液对照组制备:将 TSB 分装于 5 个无菌试管中,每管装量为 9.9 mL,同试验组操作,分别加入含菌量不

大于 10^4 cfu/mL 的金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、枯草芽孢杆菌、白色念珠菌、黑曲霉试验菌液各 0.1 mL。

供试品对照组制备:取供试液 9.9 mL,加入 TSB 0.1 mL。

回收率试验:分别取上述试验组、菌液对照组和供试品对照组溶液各 1 mL,置直径为 90 mm 的培养皿中,注入 TSA 或 SDA,混匀,凝固,TSA 平板在 35℃ 培养 3 d,SDA 平板在 25℃ 培养 5 d,计数。供试品 5 种试验菌的回收率均需进行 3 次重复试验,若供试品 5 种试验菌的回收率均为 0.5~2.0,供试品的需氧菌总数、霉菌和酵母菌总数计数方法适用性试验通过。供试品回收率(%)=(试验组菌落数-供试品对照组菌落数)/菌液对照组菌落数。试验结果见表 1 和表 2。

表 1 霉菌和酵母菌总数回收率平皿法测定结果

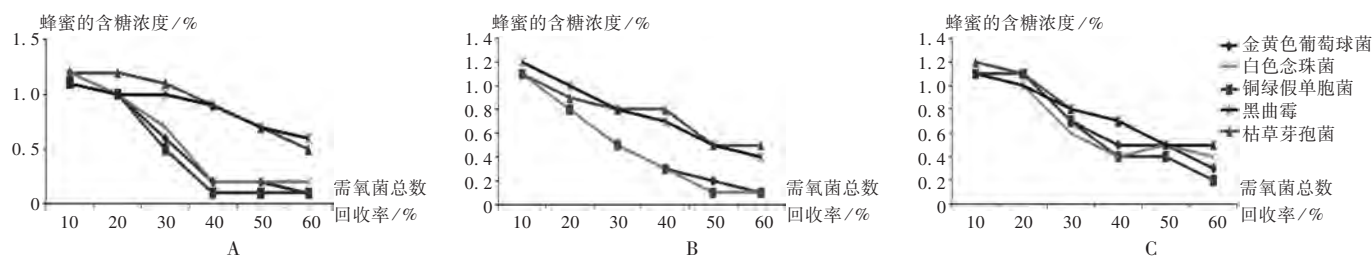
供试液		白色念珠菌				黑曲霉			
		1	2	3	$\bar{X}$	1	2	3	$\bar{X}$
槐花蜜	10%	1.3	1.2	1.2	1.2	1.3	1.2	1.1	1.2
	20%	1.1	1.2	1.1	1.1	1.3	1.2	1.1	1.2
	30%	0.6	0.7	0.6	0.6	1.2	1.0	1.1	1.1
	40%	0.3	0.3	0.2	0.3	0.8	0.8	0.8	0.8
	50%	0.2	0.2	0.1	0.1	0.7	0.8	0.7	0.7
	60%	0.2	0.2	0.1	0.1	0.6	0.5	0.6	0.6
枣花蜜	10%	1.1	1.0	1.0	1.0	1.0	1.1	1.0	1.0
	20%	0.7	0.8	0.7	0.7	1.0	1.0	1.0	1.0
	30%	0.4	0.5	0.4	0.4	0.9	0.8	0.8	0.8
	40%	0.3	0.2	0.2	0.2	0.7	0.6	0.7	0.7
	50%	0.1	0.2	0.1	0.1	0.6	0.5	0.6	0.6
	60%	0.1	0.1	0.1	0.1	0.6	0.5	0.5	0.5
椴树蜜	10%	1.1	1.0	1.0	1.0	1.1	1.2	1.1	1.1
	20%	1.0	1.0	1.0	1.0	1.1	1.0	1.0	1.0
	30%	0.6	0.7	0.6	0.6	1.0	1.0	1.0	1.0
	40%	0.4	0.3	0.2	0.3	0.8	0.7	0.8	0.8
	50%	0.2	0.3	0.2	0.2	0.8	0.6	0.8	0.7
	60%	0.1	0.2	0.1	0.1	0.6	0.5	0.7	0.6

2.5 回收率曲线图

需氧菌总数回收率详见图 1,霉菌、酵母菌总数回收率详见图 2。可见,3 种不同蜂蜜随着含糖浓度(含糖分数)的升高对金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、枯草芽孢杆菌、白色念珠菌和黑曲霉均有不同程度的抑制作用,槐花蜜和椴树蜜在含糖浓度大于 40% 时对金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌和白色念珠菌回收率试验呈显著下降趋势。而枣花蜜在含糖浓度 30% 以上时金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌和白色念珠菌的回收率便呈下降趋势。3 种蜂蜜对枯草芽孢杆菌和黑曲霉的抑制作用不明显,均为 0.5~2.0,符合 2015 年版《中国药典》要求。3 种不同蜂蜜对白色念珠菌有较明显的抑制作用,

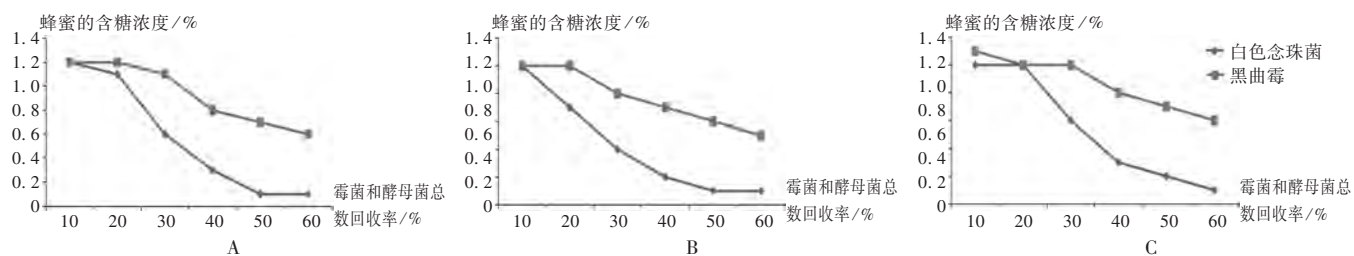
表2 需氧菌总数回收率平皿法测定结果

供试液		金黄色葡萄球菌				铜绿假单胞菌				枯草芽孢杆菌				白色念珠菌				黑曲霉			
		1	2	3	$\bar{X}$	1	2	3	$\bar{X}$	1	2	3	$\bar{X}$	1	2	3	$\bar{X}$	1	2	3	$\bar{X}$
槐花蜜	10%	1.2	1.2	1.1	1.2	1.1	1.0	1.2	1.1	1.3	1.2	1.2	1.2	1.2	1.0	1.3	1.2	1.2	1.0	1.2	1.1
	20%	1.1	0.9	1.0	1.0	1.0	1.1	1.0	1.0	1.2	1.2	1.1	1.2	1.0	0.9	1.1	1.0	1.1	1.0	1.0	1.0
	30%	0.7	0.6	0.6	0.6	0.5	0.6	0.5	0.5	1.0	1.1	1.1	1.1	0.6	0.7	0.7	0.7	0.9	1.0	1.0	1.0
	40%	0.2	0.3	0.3	0.2	0.2	0.1	0.1	0.1	1.0	0.9	0.8	0.9	0.2	0.2	0.3	0.2	0.8	0.9	0.9	0.9
	50%	0.2	0.1	0.2	0.2	0.1	0.1	0.2	0.1	0.7	0.6	0.7	0.7	0.2	0.2	0.2	0.2	0.7	0.7	0.8	0.7
	60%	0.1	0.1	0.2	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.6	0.5	0.5	0.5	0.2	0.1	0.2	0.2	0.6	0.6	0.5	0.6
枣花蜜	10%	1.1	1.2	1.1	1.1	1.2	1.1	1.1	1.1	1.2	1.1	1.1	1.1	1.0	1.1	1.1	1.1	1.1	1.2	1.2	1.2
	20%	0.8	0.7	0.8	0.8	0.9	0.7	0.8	0.8	0.9	0.9	0.8	0.9	0.7	0.8	0.8	0.8	1.0	1.0	0.9	1.0
	30%	0.5	0.4	0.5	0.5	0.5	0.5	0.4	0.5	0.8	0.9	0.8	0.8	0.4	0.5	0.5	0.5	0.7	0.8	0.8	0.8
	40%	0.3	0.4	0.3	0.3	0.2	0.3	0.3	0.3	0.7	0.8	0.8	0.8	0.3	0.4	0.3	0.3	0.7	0.7	0.8	0.7
	50%	0.2	0.2	0.1	0.2	0.1	0.1	0.2	0.1	0.5	0.5	0.6	0.5	0.1	0.2	0.1	0.1	0.5	0.5	0.5	0.5
	60%	0.1	0.2	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.5	0.4	0.5	0.5	0.1	0.1	0.1	0.1	0.4	0.4	0.3	0.4
椴树蜜	10%	1.2	1.1	1.1	1.1	1.2	1.1	1.1	1.1	1.2	1.1	1.2	1.2	1.0	1.1	1.1	1.1	1.2	1.1	1.1	1.1
	20%	1.1	1.0	1.1	1.1	1.1	1.0	1.1	1.1	1.0	1.1	1.1	1.1	1.0	1.0	1.1	1.0	1.0	1.1	1.0	1.0
	30%	0.7	0.7	0.6	0.7	0.7	0.7	0.6	0.7	0.8	0.8	0.7	0.8	0.6	0.7	0.6	0.6	0.7	0.8	0.8	0.8
	40%	0.5	0.5	0.4	0.5	0.5	0.3	0.4	0.4	0.6	0.8	0.7	0.7	0.4	0.5	0.4	0.4	0.7	0.6	0.7	0.7
	50%	0.4	0.5	0.5	0.5	0.4	0.3	0.4	0.4	0.5	0.5	0.6	0.5	0.5	0.5	0.6	0.5	0.6	0.5	0.5	0.5
	60%	0.3	0.4	0.3	0.3	0.2	0.3	0.2	0.2	0.5	0.6	0.5	0.5	0.4	0.4	0.3	0.4	0.5	0.6	0.4	0.5



A. 槐花蜜 B. 枣花蜜 C. 椴树蜜

图1 需氧菌总数回收率曲线图



A. 槐花蜜 B. 枣花蜜 C. 椴树蜜

图2 霉菌、酵母菌总数回收率曲线图

槐花蜜和椴树蜜在含糖浓度40%以上时回收率呈下降趋势,枣花蜜在含糖浓度30%以上时回收率呈下降趋势。3种蜂蜜对黑曲霉的抑制作用不明显,均为0.5~2.0。与需氧菌总数回收率试验中的白色念珠菌与黑曲霉的回收率测定结果一致。

3 讨论

采用平皿法对6个不同含糖浓度的3种蜂蜜进行需氧菌总数、霉菌和酵母菌总数回收率测定,试验结果说明,随着蜂蜜含糖浓度(含糖分数)的增加,各组试验

菌回收率均呈降低趋势。含糖浓度高的蜂蜜对金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、白色念珠菌、酵母菌均有较强抑制作用,而对枯草芽孢杆菌和黑曲霉的抑制作用相对较弱。

本研究中的蜂蜜是一种饱和甚至过饱和糖溶液^[9-10],具有很高的渗透特性(吸水性)^[11]。在高渗性环境下,足以使微生物等细菌大量脱水死亡,因此蜂蜜的高含糖浓度直接影响微生物生长^[12]。蜂蜜是天然的防腐剂,在中成药及大、小蜜丸等添加蜂蜜制剂的药品生产中,因无