

# 植物提取物微生物限量标准及检测技术进展

牟璠松<sup>1,2</sup> 罗 猛<sup>1,2</sup> 祖元刚<sup>1,2\*</sup> 付玉杰<sup>1,2</sup>

(1. 东北林业大学森林植物生态学教育部重点实验室 哈尔滨 150040)

(2. 东北林业大学林业生物制剂教育部工程研究中心 哈尔滨 150040)

**摘 要:** 植物提取物的微生物检测是保证植物产品安全性的重要手段, 制定严格的植物提取物质量控制标准体系, 特别是功能性食品、食品添加剂和植物源日用化学品等产品中微生物的检测和控制, 对产品的质量及安全保证具有重要作用, 是影响植物提取业实现全面发展的关键问题。本文主要介绍了部分国家植物提取物的微生物限量标准和植物提取物微生物检测的国内外现状与发展趋势, 并就如何建立植物提取物微生物检测行业标准体系提出了若干建议。希望对我国植物提取业实现新时期跨越式发展提供参考。

**关键词:** 植物提取物, 限量标准, 微生物检测, 对策

## Advance in Microbiological Limit and Detection Technique of Plant Extracts

MU Fan-Song<sup>1,2</sup> LUO Meng<sup>1,2</sup> ZU Yuan-Gang<sup>1,2\*</sup> FU Yu-Jie<sup>1,2</sup>

(1. Key Laboratory of Forest Plant Ecology, Ministry of Education, Northeast Forestry University, Harbin 150040)

(2. Engineering Research Center of Forestry Bio-preparation, Ministry of Education, Northeast Forestry University, Harbin 150040)

**Abstract:** Microbiological test of the plant extracts is an important measure to guarantee the safety of the plant extracts products. It is important to establish strict criterion system of the plant extracts quality control, especially for functional food, food additive and daily use chemicals from the plants. We elaborate on great significance of microbiological test of the plants extracts to the quality and safety of the plant extracts products, which is critical problem for the integrated development of the plant extracts industry. In this paper we introduced the current research and development trends on microbiological detection techniques, and also give some advice on how to establish a new standard system of microbiological test of the plant extracts industry, so that our plant extracts industry has competitive advantages on the international markets.

**Keywords:** Plant extract, Microbiological limit, Detection technique, Strategy

植物提取物(Plant extracts)是指以物理、化学和生物学等手段分离、纯化植物原料中的某一种或多种有效物质为目的而形成的以生物小分子和高分子

为主体的植物产品, 它和以动物原料为主制成的生化制剂以及应用基因工程手段制成的生物工程产品一样, 是生物医药的重要组成部分, 目前被广泛应

用于植物药、食品添加剂、功能食品、日用化学品、植物农药和植物兽药等生产领域。

在植物提取物生产中, 由获得植物目的有效物质为主线形成的高含量目的有效物质的植物新品种选育、促进目的有效物质增量的植物定向培育、植物目的有效物质的分离纯化、通过结构修饰和粒径改造等途径来增强植物目的有效物质目的功能的新材料、植物目的有效物质新剂型的制备、以动物体内实验为基础和后期临床验证来检测植物提取物功效和安全性为主要内容的植物提取物活性或功能分析、由植物提取物原料中农药残留和重金属检测与植物提取物下游或终端产品的微生物检测为主要内容的质量控制、植物提取物专用装备的制造、植物提取物产品市场准入的行政许可以及植物提取物产品的市场培育与发展等项生产经营环节, 构成了植物提取行业的主体产业链(Main chain of the plant extracts industry)。

植物提取物下游或终端产品的微生物检测是植物提取物质量控制的重要内容。微生物生命体微小, 但危害非常严重, 稍有不慎即会导致中毒甚至死亡。而植物提取物终端产品, 特别是功能性食品、食品添加剂和植物源日用化学品等, 常含有微生物生长所需要的水分、碳源和氮源, 因此在贮运过程中易使产品腐败变质; 而植物提取物产品通常为摄入性产品, 微生物滋生导致腐败变质的产品被人、畜等生物误食以后就会导致疾病或中毒。植物提取物从原料采收、生产、贮运及销售各环节都可能存在微生物污染问题, 因此对植物提取物产品进行微生物检测, 控制和减少这些过程中的污染, 从而避免因污染引起的危害至关重要。

植物提取物的微生物检测(Microbiological test of the plant extract)是保证植物提取物产品安全性的重要手段, 制定严格的植物提取物质量控制标准体系, 特别是制定微生物的检测和控制标准体系, 对产品的质量及安全保证具有重要作用, 是影响植物提取业实现全面发展的关键问题。

## 1 国内外植物提取物微生物限量标准

植物提取物微生物限量标准(Microbiological limits of the plant extract), 又称植物提取物微生物限度, 是判定植物提取物受到微生物污染的程度,

是企业从植物原料到植物提取物终端产品的生产全过程进行有关微生物控制的质量评价的主要依据。

微生物污染的控制主要是控制生物降解物和致病微生物的存在。因此控制标准应从微生物污染的潜在危险来考虑, 依据植物提取物的性质、类别、用途等规定其限量标准, 从而为植物提取物质量控制标准提供科学、合理的指导。各国药典标准分为强制性的(要求无菌)和非强制性的(允许有一定数量的菌, 即非规定灭菌的产品)可达到的限量标准, 这些标准的制定有效地规范了产品生产、检测和监督的程序。USP、BP、EP、JP 已列入有关细菌总数、霉菌和酵母菌总数及控制菌的检查。这些是非强制性的标准, 由生产企业和国家监督部门控制执行。

本文介绍了部分国家植物提取物的微生物限量标准, 这些标准为今后我国植物提取物微生物的检测和控制标准体系的完善提供了有价值的参考。

### 1.1 美国植物提取物微生物限量标准

目前植物提取物的出口标准主要依据一些欧美国家的药典, 《美国药典》收载的植物药中包括几十种原植物及其提取物(含植物油、芳香油等)<sup>[1]</sup>。美国对植物提取物的微生物限量标准分为两类, 一类是作为药品的植物提取物的微生物限量标准; 另一类是对于作为功能食品、食品添加剂类的植物提取物, FDA除要求其达到普通食品的进口标准, 即对食品进行成份分析, 对农药残留、微生物、杂质和毒素等进行检测, 同时还强调健康食品具有改善人体机能、预防疾病的功效, 并应在外包装及文字说明方面要符合FDA的法规(见表 1 和表 2)。

### 1.2 欧盟植物提取物微生物限量标准

《欧洲药典》列出了提取物通则, 收载了 3 种标准化提取物: 芦荟、番泻叶和颠茄叶标准化提取物<sup>[2]</sup>。《欧洲药典》对作为药物制剂的植物提取物微生物限量标准见表 3。

德国是欧盟成员国中草药应用历史较长的国家, 允许植物提取物作为处方药进行登记。德国进口植物药有整套的检控程序和标准, 中药饮片或中成药须在指定的药检机构做物理性状和化学成分的检测, 微生物限量标准必须至少符合下述条件方准予进口: 需氧菌  $< 10^7$  cfu/g (或cfu/mL), 霉菌  $< 10^4$  cfu/g (或cfu/mL), 大肠杆菌  $< 10^2$  cfu/g (或cfu/mL), 肠杆菌  $< 10^4$  cfu/g (或cfu/mL), 并且不含致病菌(如沙门

表 1 美国植物提取物微生物限量标准  
Table 1 Plant extract microbiological limits of United States of America

名称 Name	好氧性 微生物数 Total Aerobic micro- bial count	细菌总数 Total bacterial count	霉菌和酵 母菌总数 Total combined molds and yeasts count	大肠杆菌 <i>Escheri- chia coli</i>	沙门菌 <i>Salmonella</i> species	金黄色 葡萄球菌 <i>Staphylo- coccus</i> <i>aureus</i>	胆汁耐性革 兰氏阴性细菌 Bile-tolerant gram-negative bacteria count	肠杆菌 Enterobac- terial count
	1g	1g	1g	10g	10g	10g	1g	1g
甘菊		10 <sup>4</sup>	10 <sup>2</sup>	—	—	—		
牡荆树提取物		10 <sup>4</sup>	10 <sup>3</sup>	—	—			
洋地黄粉					—			
紫锥菊提取粉		10 <sup>4</sup>	10 <sup>3</sup>	—	—			
小白菊(粉)		10 <sup>4</sup>	10 <sup>2</sup>	—	—	—		
蒜提取粉		10 <sup>4</sup>	10 <sup>3</sup>	—	—			
蒜流体提取物		10 <sup>3</sup>	10 <sup>2</sup>	—	—			
姜(粉)		10 <sup>5</sup>	10 <sup>3</sup>	—	—		10 <sup>3</sup>	
银杏	(bacterial) 10 <sup>5</sup>		10 <sup>3</sup>	—	—		10 <sup>3</sup>	
银杏提取粉	(bacterial) 10 <sup>4</sup>		10 <sup>3</sup>	—	—			
西洋参	10 <sup>4</sup>		10 <sup>2</sup>	—	—	—		
西洋参提取粉	10 <sup>4</sup>		10 <sup>3</sup>	—	—			
亚洲参(粉)	10 <sup>4</sup>		10 <sup>2</sup>	—	—	—		
亚洲参提取粉	3×10 <sup>2</sup>		10 <sup>2</sup>	—		—		
美洲黄莲	10 <sup>4</sup>		10 <sup>3</sup>	—	—			
马栗(粉)	10 <sup>6</sup>		10 <sup>4</sup>	—	—			10 <sup>3</sup>
马栗提取粉	10 <sup>4</sup>		10 <sup>2</sup>	—	—			10 <sup>3</sup>
海岸松提取物	10 <sup>4</sup>		10 <sup>3</sup>	—	—			
紫杉醇	10 <sup>2</sup>			—	—	—	铜绿假单胞菌-	
乳蓟(粉)		10 <sup>4</sup>	10 <sup>2</sup>	—	—	—		
乳蓟提取粉		10 <sup>4</sup>	10 <sup>3</sup>	—	—			10 <sup>3</sup>
荨麻(粉)	10 <sup>6</sup>		10 <sup>4</sup>	—	—		10 <sup>3</sup>	
荨麻提取粉	10 <sup>3</sup>		10 <sup>2</sup>	—	—			
臀果木标 准提取物	10 <sup>4</sup>		10 <sup>3</sup>	—	—			
贯叶连翘(粉)		10 <sup>4</sup>	10 <sup>2</sup>	—	—	—		
贯叶连 翘提取粉		10 <sup>4</sup>	10 <sup>3</sup>	—	—			
欧车前壳			10 <sup>3</sup>	—	—			
萝芙藤(粉)					—			
缬草(粉)		10 <sup>4</sup>	10 <sup>2</sup>	—	—	—		
缬草提取粉		10 <sup>4</sup>	10 <sup>3</sup>	—	—	—		10 <sup>3</sup> 大肠菌群 10 <sup>3</sup>
小麦麸	10 <sup>4</sup>			—	—			
玉米阮	10 <sup>3</sup>			—	—			
红三叶 草提取粉	10 <sup>4</sup>		10 <sup>3</sup>	—	—			10 <sup>3</sup>

表 2 植物成分及其产品的推荐微生物限量标准  
Table 2 Recommended microbial limits for botanical ingredients and products

名称 Name	好氧性微生物总数 Total aerobic micro- bial count	霉菌和酵母菌总数 Total combined yeast and mold count	胆汁耐性革兰 氏阴性细菌 Bile-tolerant gram- negative bacteria	沙门菌 <i>Salmonella</i> species	大肠杆菌 <i>Escherichia</i> <i>coli</i>
	1 g or 1 mL	1 g or 1 mL	1 g or 1 mL	10 g	10 g
植物干燥物或粉末	10 <sup>5</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>3</sup>	—	—
植物提取物粉末	10 <sup>4</sup>	10 <sup>3</sup>		—	—
酊剂	10 <sup>4</sup>	10 <sup>3</sup>			
流浸膏剂	10 <sup>4</sup>	10 <sup>3</sup>			
输液或水煎剂	10 <sup>2</sup>	10			
植物性营养补充剂	10 <sup>4</sup>	10 <sup>3</sup>		—	—
使用前需要加沸水的植物产品	10 <sup>5</sup>	10 <sup>3</sup>			—

表 3 欧盟植物提取物微生物限量标准  
Table 3 Plant extract microbiological limits of European Union

名称 Name	好氧性微生物总数 Total viable aerobic count		肠杆菌和其他 革兰氏阴性菌 Enterobacteria and certain other gram- negative bacteria	沙门菌 <i>Salmonella</i>	大肠杆菌 <i>Escheri- chia coli</i>	金黄色 葡萄球菌 <i>Staphyloco- ccus aureus</i>
	细菌 Bacteria	真菌 Fungi				
	1 g or 1 mL		1 g or 1 mL	10 g or 10 mL	1 g or 1 mL	1 g or 1 mL
3B.不能进行抗菌预处理和有关当局可接受 但微生物污染超过 10 <sup>3</sup> 个(1g 或 1mL)的含天 然原料(动物、植物或矿物质)的口服制剂, 种类 4 中的中草药产品除外。	10 <sup>4</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>2</sup>	—	—	—
含有一种或几种成分的中草药产品(全草, 切碎或粉末)	10 <sup>7</sup>	10 <sup>5</sup>			10 <sup>2</sup>	
4A. 用前加沸水的中草药产品						
4B.使用前不需要加沸水的	10 <sup>5</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>3</sup>	—	—	

氏菌等), 其它微生物含量不得超标。

1.3 英国植物提取物微生物限量标准

英国对作为药物制剂的植物提取物微生物限量标准同《欧洲药典》, 同时《英国药典》中还对标准颠茄叶干燥提取物和标准弗朗鼠李皮干燥提取物

提出了微生物检测的限量标准<sup>[3]</sup>(见表 4)。

1.4 我国植物提取物微生物限量标准

2005 年商务部颁布了重新修订的《药用植物及制剂外经贸绿色行业标准》, 该标准规定了控制产品的微生物限量等安全性指标, 微生物限量参照

表 4 英国植物提取物的微生物限量标准  
Table 4 Plant extract microbiological limits of British

名称 Name	活菌数 Total viable aerobic count		大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i>	沙门氏菌 <i>Salmonella</i>
	1 g	1 mL	1 g or 1 mL	10 g or 10 mL
标准颠茄叶干燥提取物	10 <sup>4</sup>	10 <sup>2</sup>	—	—
标准弗朗鼠李皮干燥提取物	10 <sup>4</sup>	10 <sup>2</sup>	—	—
标准番泻叶干燥提取物	10 <sup>4</sup>	10 <sup>2</sup>	—	—

《中华人民共和国药典》2000 年版一部规定执行(注射剂除外)<sup>[4]</sup>。这对于规范并完善我国植物提取物质量控制标准体系将起到推动作用,但仍不能满足出口需要。《中华人民共和国药典》2005 年版虽几经

修订,但与欧美国家的药典相比,在控制菌的种类和限量、品种项下规定的微生物限量标准等方面还存在差距<sup>[5]</sup>,我国药典中对作为药物制剂的植物提取物的微生物限量标准见表 5。

表 5 我国植物提取物微生物限量标准  
Table 5 Plant extract microbiological limits of China

名称 Name	细菌数 Total bacteria count		霉菌和 酵母菌数 Total combined yeast and mold count		大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i>	大肠菌群 Coliform count		金黄色葡萄球菌、 铜绿假单胞菌 <i>Staphylococcus aureus</i> or <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	1 g	1 mL	1 g	1 mL	1 g or 1 mL	1 g	1 mL	1 g or 1 mL or 10 cm <sup>2</sup>
不含药材原粉的口服给药制剂	10 <sup>3</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>2</sup>		—			
含药材原粉的口服给药制剂	10 <sup>4</sup> 丸剂 3×10 <sup>4</sup>	5×10 <sup>2</sup>	10 <sup>2</sup>		—	10 <sup>2</sup>	10	
含豆豉、神曲等发酵成分的口服给药制剂	10 <sup>5</sup>	10 <sup>3</sup>	5×10 <sup>2</sup>	10 <sup>2</sup>	—	10 <sup>2</sup>	10	
用于表皮或黏膜不完整的含药材原粉的局部给药制剂	(10cm <sup>2</sup> ) 10 <sup>3</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>2</sup>					—
用于表皮或黏膜完整的含药材原粉的局部给药制剂	(10cm <sup>2</sup> ) 10 <sup>4</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>2</sup>					—
眼部给药制剂	10	—						—
耳、鼻及呼吸道吸入给药制剂	10 <sup>2</sup>	10		(鼻及呼吸道吸入给药制剂 10cm <sup>2</sup> ) —				—
阴道、尿道给药制剂	10 <sup>2</sup>	10						— 梭菌 —
直肠给药制剂	10 <sup>3</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>2</sup>		—			—
其他局部给药制剂	10 <sup>2</sup>	10 <sup>2</sup>						—

目前我国的植物提取物微生物检测和控制标准体系有待进一步完善,而我国面对植物提取物出口的绿色壁垒更亟待解决植物提取物微生物限量标准问题。因此,参照国际标准建立完善、规范的植物提取物产品质量控制标准体系,并进行动物毒理试验,明确代谢机制,尤其是控制产品的微生物限量,制定与国际接轨的植物提取物微生物限量标准势在必行。

## 2 植物提取物微生物检测技术

目前国内外微生物检测技术已从传统培养方法向分子水平迈进,并朝着自动化、标准化的方向发展。传统的微生物检测方法主要包括标准平板培育法、显微镜直接观察法、干重法、细菌长度测定法等。改进的微生物培养法主要是通过加入抑菌剂、指示剂、荧光物质等,经预处理缩短增菌时间,合并

检验步骤,使培养和鉴定一步完成,从而达到快速检测的目的。常用的方法有疏水网格滤膜法(Hydrophobic Grid Membrane Filtration, HGMF)和直接荧光过滤膜技术(Direct Epifluorescent Filter Technique, DEFT)。Al-Bakri 等采用快速二甲氧喹黄比色法([3'-[1-(phenylamino)-carbonyl]-3,4-tetrazolium]-bis(4-methoxy-6-nitro) benzenesulfonic acid hydrate), XTT)对 27 种植物提取物进行了细菌计数和抗菌活性评价,结果表明该方法是一种很有价值的方法,XTT 法和活菌计数法在评估全部有抗菌活性的实验物质中具有可比性,但是这两种方法之间没有明显的线性关系<sup>[6]</sup>。

分子生物学技术的发展使得微生物的检测技术进一步向分子水平迈进,如基因探针法、聚合酶链式反应(Polymerase Chain Reaction, PCR)技术、多聚酶链式反应结合变性梯度凝胶电泳指纹分析技术(PCR-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, PCR-

DGGE)等。PCR 技术快速、灵敏、准确,在细菌诊断方面具有广阔的前景。

免疫学方法检测细菌抗原和抗体的技术包括乳胶凝集法(Latex Agglutination Test, LAT)、酶联免疫吸附分析法(Enzyme-linked Immunosorbent Assay, ELISA)、免疫酶技术(Enzyme Immunoassay, EIA)、荧光抗体检测技术(Immunofluorescence assay, IFA)。

生物电化学方法是指通过电极测定生物量产生或消耗的电荷,从而提供分析信号的方法。微生物在次生代谢过程中,培养基的电化学性质如电流、电位、电阻和电导等会发生变化,所以可以通过检测分析这些电化学参量的变化,实现对微生物的快速测定。生物电化学方法主要包括电位分析法、电流分析法、阻抗分析法和方波极谱法。

随着微生物快速检测法的不断发展,人们进一步研制了自动、半自动微生物检测仪,主要包括免疫磁性微球、电阻电导检测器 Bactometer 系统、全自动微生物分析系统(Vietk-AMS)、VIDAS 全自动免疫分析仪等<sup>[7-9]</sup>。最近有报道称美国珀杜大学研究人员发明了一种名为“解吸电喷雾离子法”的微生物检测方法,该法 1 min 内就可快速、精确地检测出包括大肠杆菌、沙门氏菌等细菌,这种方法不仅检测限低(可达  $10^{-9}$ g),而且还可以确认细菌的亚种。

目前国际上植物提取物的微生物检测主要采用药典中提供的方法,如传统方法以及 PCR 方法,检测技术比较成熟,但研究文献比较少。国内关于植物提取物的微生物检测技术尚不成熟,没有专门的植物提取物微生物检测平台,主要是借助在食品、药品等行业的检测技术,上文提到的这些检测技术,为我们提供了很好的借鉴。

现代微生物检测的方法虽然检验效率高、特异性强、灵敏度高,但这些方法仍存在不同程度的假阳性反应,常需结合常规检测方法。今后植物提取物微生物检测技术将会逐渐向大批量、标准化、高精度和高灵敏度的方向发展。

### 3 建议及展望

当前,植物提取业已成为一个蓬勃发展的新兴产业,这对国内企业来说既是机遇又充满挑战。因此建立和完善我国植物提取业的质量控制标准体系,使终端产品的微生物含量完全符合国际检测标准是

促进我国植物提取业健康发展、增强自身竞争力、占领国际市场的必由之路<sup>[10]</sup>。为使我国植物提取业成为具有国际市场竞争优势的产业,加强植物提取物产品的微生物检测和控制,我们提出如下建议:

1) 建立植物提取物质量控制体系,严格按照国际 GMP 的标准规范产品生产操作过程,对植物提取物下游或终端产品进行无菌包装,从源头上杜绝微生物的污染。

2) 建立植物提取物微生物检测标准体系,制定与国际接轨的植物提取物微生物限量标准,建立植物提取物微生物检测技术平台,完善相关配套设施建设,培养专业的植物提取物微生物检测队伍,不断提高植物提取业的标准化水平。

3) 建立植物提取物产品安全信用体系,加强产品贮运和销售过程中的流通管理,避免二次污染,并实行产品召回制度。

4) 建立政府、行业和企业相结合的植物提取物质量监督管理机构,完善产品安全评估体系。

### 参考文献

- [1] The United States Pharmacopoeia Convention. The United States Pharmacopoeia/The National Formulary (USP 30-NF 25). Philadelphia PA: National Publishing, 2006, pp. 552, 564, 720, 901-989, 1284, 1600, 1939, 2844, 3075, 3108, 3475.
- [2] European Pharmacopoeia Commission. European Pharmacopoeia(EP 5.5). 2006, pp.449.
- [3] British Pharmacopoeia Commission. British Pharmacopoeia(BP 2007). London. 2006.
- [4] 中华人民共和国国家药典委员会. 中国药典(CP 2005)(一部). 北京:化学工业出版社, 2005, pp.761-762.
- [5] 中华人民共和国商务部.《药用植物及制剂外经贸绿色行业标准》. 2005.
- [6] Al-Bakri AG, Afifi FU. Evaluation of antimicrobial activity of selected plant extracts by rapid XTT colorimetry and bacterial enumeration. *Journal of Microbiological Methods*, 2007, **68**(1): 19-25.
- [7] 张洁梅. 食品微生物检验技术的研究进展. 现代食品科技, 2005, **21**(2): 221-222.
- [8] 陈福生, 高志贤, 王建华. 食品安全检测与现代生物技术. 北京:化学工业出版社, 2004, pp.80-90, 146-152.
- [9] Malorny B, Tassios PT, Radstrom P, *et al.* Standardization of diagnostic PCR for the detection of food borne pathogens. *International Journal of Food Microbiology*, 2003, **83**(1): 39-48.
- [10] 祖元刚, 罗 猛, 牟璠松. 植物生态提取业的现状与发展趋势. 现代化工, 2007, **27**(7): 1-5.