

## 4 种发酵法炮制中药材的微生物初步研究

蔡清宇<sup>1\*</sup>, 郑虎占<sup>2</sup>, 王敏<sup>1</sup>

(1. 海军总医院药剂科, 北京 100048; 2. 北京中医药大学中药学院, 北京 100102)

**[摘要]** 目的:通过对发酵法炮制的 4 种中药材(生神曲、生建曲、生半夏曲、生淡豆豉)进行相关的微生物培养、鉴定及分析,进而确定其内在质量,为临床安全用药提供参考。方法:采用血平板、沙氏、中国蓝及常规空气 4 种培养皿分别对上述中药材进行细菌培养及形态学检测。结果:4 种中药材在常规空气培养皿中均培养出较多杂菌,在中国蓝培养皿中均培养出一定量 G<sup>-</sup>杆菌。在血平板中培养出不同程度的 G<sup>+</sup>杆菌、G<sup>-</sup>杆菌、G<sup>+</sup>球菌、真菌孢子等,在沙氏培养基中只有生神曲及生建曲培养出真菌并形态学鉴定为酵母菌。结论:生神曲和生建曲培养出较多的真菌酵母菌为发酵法产生的有益菌,而生半夏曲和生淡豆豉却未发现真菌存在,因此应提醒关注发酵炮制的过程,进一步确保药材质量。

**[关键词]** 发酵;炮制;真菌;微生物

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)06-0119-03

## Initial Study on Microbial of Four Kinds of Chinese Medicinal Materials Processed by Fermentation Method

CAI Qing-yu<sup>1\*</sup>, ZHENG Hu-zhan<sup>2</sup>, WANG Min<sup>1</sup>

(1. Department of Pharmacy, Navy General Hospital, Beijing 100048, China;

2. School of Chinese Pharmacy, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China)

**[Abstract]** **Objective:** Four kinds of Chinese medicinal materials (medicated leaven, Jianqu, pinellia rhizome fermented mass, semen sojae praeparatum) processed by fermentation method were studied through the correlative microbial culture, identification and analysis, to confirm the inherent quality and provide reference for using medicinal materials safely and effectively in clinical. **Method:** Four kinds of culture dishes (blood plate, Sabouraud, Chinese blue and conventional air) were used to make bacterial culture and morphological testing to the above Chinese medicinal materials. **Result:** The four Chinese medicinal materials were all cultured more miscellaneous bacteria in the conventional air dishes; gram-negative bacilli were cultured in some Chinese blue Petri dishes; while gram-positive bacillus, gram-negative bacillus, gram-positive coccus and fungal spores were cultured in blood plate in varying degrees; in sabouraud medium, only raw medicated leaven and raw Jianqu could culture fungoid which was distinguished as microzyme by morphological identification. **Conclusion:** Raw medicated leaven and Jianqu cultured more fungoid microzyme which were beneficial bacteria produced by fermentation. But fungoid have not been found in pinellia rhizome fermented mass and semen sojae praeparatum. Therefore, attention should be paid to the process of fermentation processing, so as to further ensure the quality of medicine materials.

**[Key words]** fermentation; processing drugs; fungoid; microorganism

中药发酵法是经净制或处理后的药物,在一定的温度和湿度条件下,由于真菌和酶的催化分解作用,使药物发泡、生衣的方法。经发酵法炮制过的药

材改变了原有的性能,产生了新的治疗作用<sup>[1]</sup>。发酵法炮制的中药材主要有生神曲、生建曲、生半夏曲和生淡豆豉,发酵炮制过程的条件控制直接关系到药材的质量,本研究对 4 种发酵炮制后的中药材进行了微生物培养、鉴定及分析,根据所含发酵真菌的情况来判断药材的质量,为提高临床用药的安全性

**[收稿日期]** 2011-09-16

**[通讯作者]** \*蔡清宇, Tel: 13578698676, E-mail: caining1977

@ 163. com

和有效性提供参考。

### 1 材料

**1.1 样品** ①生神曲(购自北京人卫饮片制药厂,批号 11070101),②生建曲(购自北京鹤延龄饮片制药厂,批号 110404),③生半夏曲(购自北京鹤延龄饮片厂,批号 101154),④淡豆豉(购自中国药材公司,批号 110201)。

**1.2 微生物检测培养基** 沙保罗培养基(批号 110921-1),血琼脂培养基(注册号 1400001),中国蓝琼脂培养基(注册号 2400053),空气培养基,增菌肉汤(自制)。

**1.3 仪器** 烧杯、定量接种环、酒精灯、电热恒温培养箱(DRP-9272 型)、高压蒸气灭菌锅等。

### 2 方法

**2.1 样本处理** 取生建曲样品,用刀片去除表层,取内部药材研磨成粉,过 20 目筛。称取粉末 1.0 g 放入烧杯 1 中,再加入 10 mL 肉汤增菌,于 37 °C 电热恒温箱中培养 24 h。再用同样方法称取生半夏曲粉末于烧杯 2 中,生淡豆豉粉末于烧杯 3 中,生神曲粉末于烧杯 4 中,分别用标签标注(以上实验用品均经灭菌处理,整个操作过程在无菌条件下进行)。

**2.2 培养菌丝** 从恒温箱中将增菌液 1,2,3,4 取出。用 10 μL 定量接种环取 10 μL 分别加入血琼脂培养基、中国蓝琼脂培养基、沙保罗培养基、空气培养基中。接种后的培养基放入 37 °C 电热恒温箱中孵育 24 h。

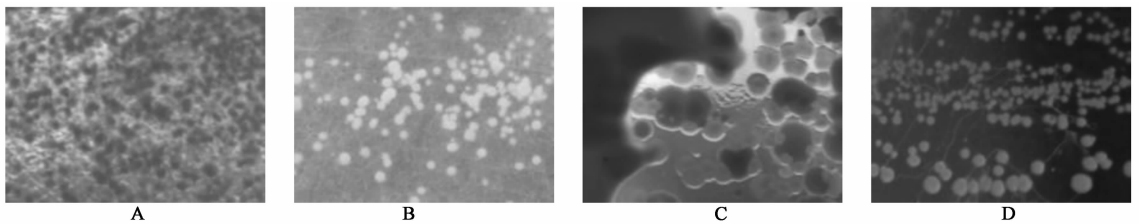
**2.3 纯化培养** 根据菌落特征、细菌、真菌形态、大小、革兰染色的不同,挑取单个菌落再进行纯化培养,并进行显微鉴定<sup>[2]</sup>。

### 3 结果

**3.1 4 种发酵中药材基础培养** 空气培养皿及血平板适宜多种菌的培养和繁殖,中国蓝培养皿提供了阴性菌适宜的繁殖条件而沙氏培养皿提供了真菌适宜的繁殖条件。在空气培养皿及血平板中,4 种发酵中药材均培养出多种菌,除菌落数稍有差异外,形态学特征基本一致;在中国蓝培养皿中,4 种发酵中药材均培养出 G-菌,形态鉴定未见明显差异;只有生神曲及生建曲在沙氏培养皿中培养出真菌菌落,特征为奶油样,光滑,闪光,并有白菌丝存在,初步形态学鉴定为酵母菌,而生半夏曲和生淡豆豉在沙氏培养基中未培养出真菌,呈阴性结果。见表 1 和图 1。

表 1 生建曲、生半夏曲、生淡豆豉和生神曲基础培养

样品	血平板	中国蓝	沙氏	空气
生建曲	G+杆、G-杆 真菌孢子	G-菌	丝状真菌(较多) 酵母菌(少量)、真菌孢子	杂菌 > 10 万/mL
生半夏曲	G+杆、G-杆	G-菌	无	杂菌 > 10 万/mL
生淡豆豉	G+杆、G-杆、G+球	G-菌	无	杂菌 > 10 万/mL
生神曲	G+杆、G-杆、G+球 真菌孢子	G-菌	丝状真菌、真菌孢子 酵母菌(较多)、霉菌(少量)	杂菌 > 10 万/mL



A. 空气培养皿; B. 沙氏培养皿; C. 血琼脂培养皿; D. 中国蓝培养皿

图 1 4 种发酵药材基础培养结果

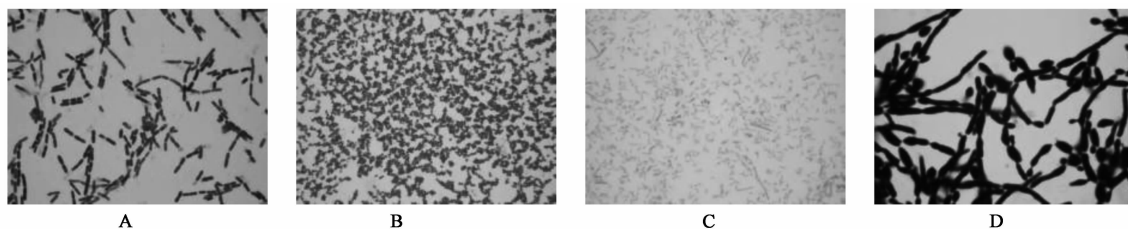
**3.2 4 种发酵中药材纯化培养及镜检** 4 种发酵中药材经进一步纯化培养后进行了革兰染色及镜鉴,发现血平板中主要为 G+杆菌(细长、链状蓝紫色菌落)和 G+球菌(细小、圆形,蓝紫色菌落),4 药材之间无明显差异;中国蓝培养皿中均为 G-杆菌(粗

短、杆状淡红色菌落),4 药材镜鉴结果相同;在沙氏培养皿中,生建曲及生神曲均培养出较纯净的酵母菌(暗紫色,分枝状,有菌丝连接),但镜鉴未见到成功染色的毛状霉菌。见表 2 和图 2。

表2 生建曲、生半夏曲、生淡豆豉和生神曲纯化培养

样品	血平板	中国蓝	沙氏
生建曲	G+杆	G-杆	丝状酵母菌(较多)
生半夏曲	G+杆	G-杆	无
生淡豆豉	G+杆、G+球	G-杆	无
生神曲	G+杆、G+球	G-杆	酵母菌、毛状霉菌(极少)

注:空气培养皿杂菌过多,未再进行纯化培养。



A. G+杆菌; B. G+球菌; C. G-杆菌; D. 酵母菌

图2 4种发酵药材纯化培养

#### 4 讨论

关于发酵法炮制的中药材,文献资料记载最多的为神曲。胡静等<sup>[3]</sup>对中药神曲进行了相关的微生物研究,发现神曲样本中含有大量的酵母菌,有的含有少量的乳酸杆菌,但均含有大量杂菌,提出发酵神曲过程中微生物的数量及种类不易控制。高慧等<sup>[4]</sup>进行了单一菌种发酵神曲的质量比较,认为菌种固定,能够保证发酵生产的稳定性及产品质量,但未考虑不同菌种间的协同作用,尚待进一步研究。

对于中药发酵炮制的方法,李羿等<sup>[5]</sup>进行了本草考证及机制探讨,中药的发酵炮制属于自然发酵,在发酵菌种、培养基成分和培养条件等方面都存在一定的波动,整个发酵炮制的过程都是凭主观经验来控制,难于客观地准确控制。因此,经发酵炮制的中药其质量的稳定性难于保证。《中国药典》<sup>[6]</sup>仅收录了发酵炮制中药材中淡豆豉一个品种,并在质量控制方面未列入微生物检测项,可见对于发酵药材的微生物控制方面尚有欠缺。虽然中药材在煎煮的加热过程中会达到不同程度的灭菌,但有些微

生物不能达到真正的灭活,会影响到药物的治疗效果及煎液的保存时限,应引起足够的重视。

综上所述,4种中药材均培养出较多杂菌和一定量G-杆菌,说明在发酵炮制过程未控制好温湿度使得杂菌生长过多。而发酵法本身提供了真菌适宜的繁殖条件,但生半夏曲(批号101154)及生淡豆豉(批号110201)却未培养出阳性结果,应属较劣质药材。

生物不能达到真正的灭活,会影响到药物的治疗效果及煎液的保存时限,应引起足够的重视。

本研究对临床常用的4种发酵炮制中药材进行了相关微生物检测,在菌落形态,染色结果,镜鉴判定方面提供有效信息,为制定发酵中药材质量控制标准提供参考,进而保证临床用药的安全有效。

#### [参考文献]

- [1] 龚千锋,丁安伟,孙秀梅,等. 中药炮制学[M]. 北京:中国中医药出版社,2003:333.
- [2] 范秀容,李广武,沈萍. 微生物学实验[M]. 北京:高等教育出版社,1995:107.
- [3] 胡静,杨旭东,夏清平,等. 中药“神曲”中微生物的研究[J]. 牡丹江医学院学报,2004,25(2):19.
- [4] 高慧,贾天柱. 单一菌种发酵神曲的质量比较研究[J]. 中国中药杂志,2008,33(20):2323.
- [5] 李羿,万德光. 中药发酵炮制的本草考证及作用机理探讨[J]. 成都中医药大学学报,2010,33(1):69.
- [6] 中国药典. 一部[S]. 2010:308.

[责任编辑 蔡仲德]