

不同灭菌方法对天麻首乌片生药粉的 灭菌效果及有效成分含量的影响

胥双¹, 彭艳梅², 苏文俏¹, 李跃辉², 胥新元¹

(1. 湖南省中医药研究院, 湖南 长沙, 410013;

2. 湖南省传统中药制剂质量评价和溯源工程中心, 湖南 长沙, 410003)

[摘要] 目的: 考察不同灭菌方法用于天麻首乌片原生药粉的灭菌效果及灭菌对目标成分天麻素、阿魏酸及二苯乙烯苷含量的影响。方法: 分别采用湿热、微波、75%乙醇流通蒸汽、⁶⁰Co辐照4种灭菌方法对天麻首乌片中原生药粉进行灭菌处理, 测定灭菌前后原生药粉的微生物限度; 采用高效液相色谱法测定灭菌前后天麻素、阿魏酸和二苯乙烯苷的含量。结果: 微生物限度检测结果显示, 上述4种灭菌方法的灭菌率依次分别为99.21%、95.24%、77.78%、99.21%; 目标成分检测结果表明, ⁶⁰Co辐照灭菌对天麻素、阿魏酸和二苯乙烯苷含量影响最小, 其次是75%乙醇流通蒸汽灭菌, 而微波和湿热2种灭菌方法对天麻素、阿魏酸和二苯乙烯苷含量的影响最大。结论: 综合灭菌效果及对有效成分的影响, 天麻首乌片原生药粉灭菌方法建议选用⁶⁰Co辐照灭菌。

[关键词] 天麻首乌片; 灭菌; 湿热; 75%乙醇流通蒸汽; 微波; ⁶⁰Co辐照; 实验研究

[中图分类号] R282.4 **[文献标识码]** A **DOI:** 10.16808/j.cnki.issn1003-7705.2019.12.047

Sterilizing effect of different sterilizing methods on crude powder of Tianma Shouwu tablets and their influence on the content of effective constituents

XU Shuang¹, PENG Yanmei², SU Wenqiao¹, LI Yuehui², XU Xinyuan¹

(1. Hunan Academy of Chinese Medicine, Changsha 410013, Hunan, China;

2. Hunan Provincial Center for Quality Assessment and Traceability of Traditional Chinese Medicine Preparations, Changsha 410003, Hunan, China)

[Abstract] Objective: To investigate the sterilizing effect of different sterilizing methods on crude powder of Tianma Shouwu tablets and the influence of sterilization on the content of gastrodin, ferulic acid, and stilbene glucoside. Methods: The crude powder of Tianma Shouwu tablets was sterilized by moist heat sterilization, microwave, 75% alcohol circulating steam, and ⁶⁰Co irradiation, respectively, and microbial limit was measured before and after sterilization. High-performance liquid chromatography was used to measure the content of gastrodin, ferulic acid, and stilbene glucoside before and after sterilization. Results: The results of microbial limit showed that the above four methods had a sterilization rate of 99.21%, 95.24%, 77.78%, and 99.21%, respectively. As for the content of the above constituents, ⁶⁰Co irradiation had the least influence on the content of gastrodin, ferulic acid, and stilbene glucoside, followed by 75% alcohol circulating steam, and microwave and moist heat sterilization had the greatest influence on the content of these constituents. Conclusion: Based on comprehensive sterilizing effect and the influence on the content of effective constituents, ⁶⁰Co irradiation is suggested as the preferred sterilizing method for crude powder of Tianma Shouwu tablets.

[Key words] Tianma Shouwu tablets; sterilization; moist heat sterilization; 75% alcohol circulating steam; microwave; ⁶⁰Co irradiation; experimental study

中药材和中成药的灭菌是中药临床安全保证的必要因素, 而微生物限度指标又是确保中成药尤其是含原生药粉制剂质量及安全的关键之一^[1-2]。灭菌操作作为影响中药及其制剂质量的关键操作单元, 将直接影响着药品安全、有效及质量稳定, 目前中药制剂中常采用的灭菌方法主要有:

湿热灭菌、乙醇蒸汽灭菌、微波灭菌及⁶⁰Co辐照灭菌等, 这些灭菌方法用于固体制剂或多或少存在着不足^[3-4], 为达到2015年版《中国药典》规定的微生物限度标准, 现拟采用湿热、75%乙醇流通蒸汽、微波、⁶⁰Co辐照4种灭菌方法对天麻首乌片原生药粉的灭菌方法进行比较研究, 以灭菌率和天

第一作者: 胥双, 男, 执业中药师, 研究方向: 中药制剂

通讯作者: 胥新元, 男, 主任药师, 研究方向: 中药制剂

麻素、二苯乙烯苷和阿魏酸的含量作为评价指标,筛选合适的灭菌方法,为天麻首乌片的生产灭菌工艺提供依据。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 T-214 型电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司);LC-20AT 型高效液相色谱仪(日本岛津);AL204 型电子天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司];KQ3200 型超声清洁仪(昆山市超声仪器有限公司);101-2AB 型电热恒温鼓风干燥箱(天津市泰斯特仪器有限公司);LDAM 立式压力蒸汽灭菌器(上海申安医疗器械厂);G70F23N1P-M8(S0)型微波炉(广东格兰仕集团有限公司);250B 生化培养箱(金坛市富华仪器有限公司);SW-OJ-TFD 型洁净工作台(苏净集团安泰空气技术公司)。

1.2 药物与试剂 天麻、川芎、何首乌细粉均由湖南国华制药有限公司提供;天麻素对照品(批号:110807-201507)、阿魏酸对照品(批号:110773-201313)、2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷对照品(批号:110844-201310)均购于中国食品药品检定研究院;甲醇、乙腈(一级色谱纯 Honeywell Burdick & Jackson);水为重蒸馏水;其他试剂均为分析纯。

2 方法及结果

2.1 灭菌样品制备 按处方比例称取天麻 600g、何首乌 1000g、川芎 400g,过 80 目筛,混合均匀,制成天麻首乌片原生药粉。

2.2 灭菌方法 根据原生药粉预实验结果,确定天麻首乌片原生药粉各灭菌方法及参数如下:1)湿热灭菌。取“2.1”项下原生药粉 200g,采用压力蒸汽灭菌器进行灭菌,灭菌温度 121℃,灭菌时间 30min,然后在 60℃ 无菌条件下通风干燥后,备用。2)75% 乙醇流通蒸汽。取“2.1”项下原生药粉 200g,用乙醇蒸汽灭菌柜进行灭菌,灭菌时 75% 乙醇用量为物料的 20%,灭菌时间 2h,然后在 60℃ 无菌条件下通风干燥后,备用。3)微波灭菌。取“2.1”项下原生药粉 200g,用微波炉进行灭菌,功率 800MHz,灭菌时间 3min,备用。4)⁶⁰Co 辐照灭菌。取“2.1”项下原生药粉 200g,送辐照中心进行⁶⁰Co 辐照灭菌,辐照剂量 6K Gy,灭菌时间 12h,备用。

2.3 不同灭菌方法灭菌效果的考察 分别取灭菌前后的混合原生药粉,按照《中国药典》(2015 年版四部)通则 1105 “非无菌产品微生物限度检查法”测定需氧菌总数、霉菌和酵母菌总数^[5],灭菌率=(灭菌前的细菌总数-灭菌后的细菌总数)/灭菌前的细菌总数×100%。结果见表 1。

表 1 灭菌前后原生药粉微生物限度检查结果

灭菌方法	灭菌前原生药 的需氧菌 总数(cfu/g)	灭菌后原生药 的需氧菌 总数(cfu/g)	灭菌率 (%)	灭菌前原生药 的霉菌和酵母 菌总数(cfu/g)	灭菌后原生药 的霉菌和酵母 菌总数(cfu/g)	灭菌率 (%)
湿热灭菌	6400	60	99.06	1260	10	99.21
75%乙醇流通蒸汽	6400	1280	80.00	1260	280	77.78
微波	6400	80	98.75	1260	60	95.24
⁶⁰ Co 辐照灭菌	6400	40	99.38	1260	10	99.21

2.4 不同灭菌方法对目标成分含量的影响

2.4.1 天麻素 依据《中国药典》天麻项下天麻素含量测定

方法,测定灭菌前后混合原生药粉中天麻素含量,结果见表 2。

表 2 不同灭菌方法对天麻素含量的影响(%)

灭菌方法	灭菌前	灭菌后	增加
湿热灭菌	0.450	0.611	35.78
75%乙醇流通蒸汽	0.450	0.451	0.22
微波	0.450	0.496	10.22
⁶⁰ Co 辐照灭菌	0.450	0.450	0

2.4.2 二苯乙烯苷 依据《中国药典》何首乌项下二苯乙烯苷含量测定方法,测定灭菌前后混合原生药粉中二苯乙烯苷含量,结果见表 3。

表 3 不同灭菌方法对二苯乙烯苷含量的影响(%)

灭菌方法	灭菌前	灭菌后	损失
湿热灭菌	1.177	0.962	18.27
75%乙醇流通蒸汽	1.177	1.119	2.38
微波	1.177	1.165	1.02
⁶⁰ Co 辐照灭菌	1.177	1.177	0

2.4.3 阿魏酸 依据《中国药典》川芎项下阿魏酸含量测定方法,测定灭菌前后混合原生药粉中阿魏酸的含量,结果见表 4。

表 4 不同灭菌方法对阿魏酸含量的影响(%)

灭菌方法	灭菌前	灭菌后	损失
湿热灭菌	0.106	0.014	86.79
75%乙醇流通蒸汽灭菌	0.106	0.084	20.75
微波灭菌	0.106	0.063	40.57
⁶⁰ Co 辐照灭菌	0.106	0.103	2.83

3 讨论

上述结果显示,4 种灭菌方法对天麻首乌片原生药粉均有一定的灭菌效果,其中⁶⁰Co 辐照灭和湿热灭菌的灭菌率均达到 99% 以上,其次是微波灭菌,其灭菌率可达到了 95% 以上,符合《中国药典》通则 1107 中非无菌药用原料的微生物限度标准。乙醇蒸汽灭菌是以一定浓度乙醇作为杀菌剂,通过对药材熏蒸及闷润从而达到灭菌目的,灭菌机制是通过抽真空形成负压使乙醇渗透药材深入微生物内部,使其蛋白质变性,进而杀死微生物,常用浓度为 70%~75%^[6-7]。而本实验中,75% 乙醇蒸汽灭菌效果较差,灭菌率仅有 77.78%。实验过程中发现,湿热灭菌和微波灭菌等加热过程对天麻素的含量有明显的影 响,高效液相色谱法检测其含量分别增加 35.78%、10.22%,而预实验的薄层鉴别试验也验证了这一点,说明天麻素对热不稳定,且在一定范围内随着加热温度的升高,天麻素的含量也逐渐升高,这可能与温度升高加快了天麻苷酶的活化,促进了天麻素的生成有关,其具体原因有待进一步的研究。阿魏酸是川芎的主要成分,常作为川芎的定性定量指标,用于评价及控制其品质,但阿魏酸极易受温度的影响。传统的湿热灭菌以及近年来逐渐发展的微波灭菌都会大幅降低川芎中阿魏酸的含量^[8]。实验结果表明,湿热灭菌使阿魏酸含量降低 86.79%,微波灭菌降低 40.57%,而作为冷灭菌的⁶⁰Co 辐射灭菌则仅降低了 2.83%。(下转第 146 页)

- Complementary & Alternative Medicine, 2012, 12(1): 1-10.
- [9] Park J, White AR, Ernst E. Efficacy of acupuncture as a treatment for tinnitus: a systematic review [J]. Archives of otolaryngology - head & neck surgery, 2000, 126(4): 489.
 - [10] Miller AR. Pathophysiology of tinnitus. [J]. Otolaryngologic Clinics of North America, 2003, 36(2): 249-266.
 - [11] Hui KKS, Liu J, Makris N, et al. Acupuncture modulates the limbic system and subcortical gray structures of the human brain: Evidence from fMRI studies in normal subjects [J]. Human Brain Mapping, 2000, 9(1): 13.
 - [12] Müller AR. The role of neural plasticity in tinnitus [J]. Progress in Brain Research, 2007(166): 37-45, 544.
 - [13] Manni L, Albanesi M, Guaragna M, et al. Neurotrophins and acupuncture [J]. Autonomic Neuroscience Basic & Clinical, 2010, 157(1-2): 9.
 - [14] Levine RA, Nam EC, Oron Y, et al. Evidence for a tinnitus subgroup responsive to somatosensory based treatment modalities [J]. Progress in Brain Research, 2007, 166(1): 195-207.
 - [15] Briner W. A behavioral nosology for tinnitus [J]. Psychological Reports, 1995, 77(1): 27.
 - [16] Bradbrook D. Acupuncture treatment of phantom limb pain and phantom limb sensation in amputees [J]. Acupuncture in Medicine Journal of the British Medical Acupuncture Society, 2004, 22(2): 93.
 - [17] 汪金宇, 万璠, 程为平. 耳周围刺法治疗神经性耳鸣耳聋的临床体会 [J]. 针灸临床杂志, 2014, 30(6): 55-57.
 - [18] 汤国娟, 郎伯旭, 李国贤. 中医针刺项八穴联合药物治疗颈源性耳鸣临床疗效观察 [J]. 中华中医药学刊, 2016, 34(1): 233-235.
 - [19] 李静, 郭会敏, 张晓哲, 等. 针刺捻转泻法治疗肝火上扰型耳鸣临床观察 [J]. 中国针灸, 2016, 36(12): 1263-1265.
 - [20] 石磊, 冷辉, 李媛, 等. 强刺激针刺手法治疗肝气郁结型耳鸣的临床疗效研究 [J]. 世界中西医结合杂志, 2016, 11(4): 540-543.
 - [21] Laureano MR, Onishi ET, Bressan RA, et al. The effectiveness of acupuncture as a treatment for tinnitus: a randomized controlled trial using 99m Tc - ECD SPECT [J]. European Radiology, 2016, 26(9): 1-9.
 - [22] Kim BH, Kim K, Nam HJ. A comparative study on the effects of systemic manual acupuncture, periauricular electroacupuncture, and digital electroacupuncture to treat tinnitus: A randomized, paralleled, open - labeled exploratory trial [J]. BMC Complement Altern Med, 2017, 17(1): 85.
 - [23] Naderinabi B, Soltanipour S, Nemati S, et al. Acupuncture for chronic nonpulsatile tinnitus: A randomized clinical trial [J]. Caspian Journal of Internal Medicine, 2018, 9(1): 38-45.
 - [24] 房雪, 苏布衣, 李苗苗, 等. 耳门、听会穴深刺配合电针治疗肝胆火盛型耳鸣的临床疗效观察 [J]. 浙江中医药大学学报, 2017, 41(6): 542-544.
 - [25] 孙远征, 刘琳, 于天洋. 不同波形电针治疗肾精亏虚型耳鸣的临床疗效观察 [J]. 针灸临床杂志, 2017, 33(3): 32-34.
 - [26] Doi MY, Tano SS, Schultz AR, et al. Effectiveness of acupuncture therapy as treatment for tinnitus: a randomized controlled trial [J]. Brazilian Journal of Otorhinolaryngology, 2016, 82(4): 458-465.
 - [27] 李俊, 葛书翰. 深刺耳周穴配合头针治疗感音神经性耳鸣疗效观察 [J]. 上海针灸杂志, 2016, 35(3): 304-305.
 - [28] 金泽, 高云竹. 电针双侧晕听区配合体针治疗耳鸣临床观察 [J]. 上海针灸杂志, 2015, 34(12): 1198-1199.
 - [29] 曹奕, 江娜, 董海彦. 温针灸治疗耳鸣临床观察 [J]. 上海针灸杂志, 2014, 33(12): 1124-1126.
 - [30] 周歆, 阮经文, 李滋平, 等. 颈夹脊穴埋线配合耳周局部穴电针治疗神经性耳鸣近、远期疗效分析 [J]. 中国针灸, 2015, 35(1): 32-35.
 - [31] 祝天翔, 周士华, 陈华平, 等. 腹针结合补肾开窍丸治疗肾精亏虚型神经性耳鸣的临床研究 [J]. 针灸临床杂志, 2016, 32(4): 38-41.
 - [32] 张春会, 杨丽辉, 白忠. 耳鸣综合治疗的研究进展 [J]. 世界最新医学信息文摘, 2017, 17(60): 60-62.
 - [33] Hoekstra CE, Rynja SP, van Zanten GA, et al. Anticonvulsants for tinnitus [J]. Cochrane Database Syst Rev, 2011, 66(7): CD007960.
 - [34] Savage J, Cook S, Waddell A. Tinnitus [published online November 12, 2009]. Clin Evid (Online). 2009, 2009: 0506.
 - [35] Shargorodsky J, Curhan GC, Farwell WR. Prevalence and Characteristics of Tinnitus among US Adults [J]. American Journal of Medicine, 2010, 123(8): 711-718.
 - [36] Liu F, Han X, Li Y, et al. Acupuncture in the treatment of tinnitus: a systematic review and meta - analysis [J]. European Archives of Oto - Rhino - Laryngology, 2016, 273(2): 285-294.

(收稿日期: 2018-12-17)

(上接第116页)

综上所述, 确定天麻首乌片原生药粉采用辐照灭菌, 辐照剂量为6kGy, 该辐照剂量符合《⁶⁰Co辐照中药灭菌剂量标准》中关于中药原料粉辐照剂量的规定。

参考文献

- [1] 王东, 黄洁燕, 郭丽冰, 等. 不同灭菌方法对保济丸中木香及木香药材有效成分的影响 [J]. 时珍国医国药, 2013, 24(1): 112-113.
- [2] 张启明, 何颖, 卢鹏伟, 等. 不同灭菌方法灭菌效果及对目标成分影响考察 [J]. 河南大学学报: 医学版, 2005, 24(1): 29-31.
- [3] 冯少俊, 伍振峰, 王雅琪, 等. 中药灭菌工艺研究现状及问题分析 [J]. 中草药, 2015, 46(18): 2667-2673.
- [4] 周苗, 陈树和, 朱田密, 等. 天楼解毒消肿散两种灭菌方法的比较研究 [J]. 中国药房, 2015, 6(13): 1770-1772.
- [5] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 (2015年版四部) [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 140-144.
- [6] 严丹, 袁星, 解达帅, 等. 中药饮片灭菌的研究现状与思考 [J]. 中草药, 2016, 47(8): 1425-1429.
- [7] 陈天朝, 徐丽军, 宋薇. 中药固体制剂灭菌技术研究现状、问题及对策 [J]. 中医学报, 2013, 28(7): 1015-1017.
- [8] 但旭辉, 徐小彬, 黎明, 等. 川芎灭菌方法研究 [J]. 广西中医药, 2013, 36(3): 80-81. (收稿日期: 2019-06-19)