

# 天楼解毒消肿散两种灭菌方法的比较研究<sup>△</sup>

周 苗<sup>1,2\*</sup>, 陈树和<sup>1#</sup>, 朱田密<sup>1</sup>, 王秀兰<sup>1</sup>, 巴元明<sup>1</sup>, 刘焱文<sup>2</sup>(1.湖北省中医院, 武汉 430061; 2.湖北中医药大学中药资源与中药复方省部共建教育部重点实验室, 武汉 430061)

中图分类号 R944 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)13-1770-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.13.12

**摘 要** 目的: 比较两种灭菌法对天楼解毒消肿散的灭菌效果与重楼皂苷含量的影响。方法: 采用紫外照射和<sup>60</sup>Co辐照对天楼解毒消肿散进行灭菌处理, 按《中国药典》进行微生物限度检查; 采用高效液相色谱法测定天楼解毒消肿散灭菌前后重楼皂苷 I、II、VI、VII 的含量。结果: 紫外照射灭菌后天楼解毒消肿散中重楼皂苷 I、II、VI、VII 的总量平均下降约 5%, 微生物限度检查为不合格; <sup>60</sup>Co 辐照灭菌后天楼解毒消肿散中重楼皂苷 I、II、VI、VII 的总量平均下降约 17%, 微生物限度检查为合格。结论: 两种灭菌方法均对天楼解毒消肿散中重楼皂苷含量有影响, <sup>60</sup>Co 辐照灭菌后样品微生物限度达到《中国药典》要求。

**关键词** 天楼解毒消肿散; 紫外照射灭菌; <sup>60</sup>Co 辐照灭菌; 微生物限度检查; 重楼皂苷; 含量测定

## Comparison Study on 2 Kinds of Sterilization Methods for Tianlou Jiedu Xiaozhong Powder

ZHOU Miao<sup>1,2</sup>, CHEN Shu-he<sup>1</sup>, ZHU Tian-mi<sup>1</sup>, WANG Xiu-lan<sup>1</sup>, BA Yuan-ming<sup>1</sup>, LIU Yan-wen<sup>2</sup>(1.Hubei Provincial Hospital of TCM, Wuhan 430061, China; 2.Key Laboratory of TCM Resources and TCM Compound of China's Ministry of Education, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430061, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To compare the sterilization effects of 2 sterilization methods on Tianlou jiedu xiaozhong powder and the effects on the content of polyphyllin. METHODS: UV irradiation and <sup>60</sup>Co irradiation were used to sterilize Tianlou jiedu xiaozhong powder and microbial limit test was conducted with *Chinese Pharmacopoeia*. HPLC was used to determine the content of polyphyllin I, II, VI and VII in Tianlou jiedu xiaozhong powder before and after sterilization. RESULTS: The total content of polyphyllin I, II, VI and VII in Tianlou jiedu xiaozhong powder was averagely decreased about 5% after UV irradiation sterilization, microbial limit test was unqualified; the total content of polyphyllin I, II, IV and VII in Tianlou jiedu xiaozhong powder was averagely decreased about 17% after <sup>60</sup>Co irradiation sterilization, microbial limit test was qualified. CONCLUSIONS: 2 kinds of sterilization methods have effects on the content of polyphyllin in Tianlou jiedu xiaozhong powder and the sample microbial limit reaches the requirements of *Chinese Pharmacopoeia* after <sup>60</sup>Co irradiation sterilization.

**KEYWORDS** Tianlou jiedu xiaozhong powder; UV irradiation sterilization; <sup>60</sup>Co irradiation sterilization; Microbial limit test; Polyphyllin; Content determination

目前中药散剂常采用的灭菌方法主要有: 干热灭菌法、环氧乙烷(EO)灭菌法、臭氧灭菌法、紫外线灭菌法及<sup>60</sup>Co辐照灭菌法<sup>[1]</sup>。这些灭菌方法用于固体制剂灭菌或多或少存在一些不足。干热灭菌法适用于耐高温样品, 采用此法灭菌时, 样品不能排列过密, 以保证灭菌的有效性和均一性。EO灭菌法可以穿透微孔, 达到物体相应的深度, 但缺点是易燃易爆, 残留物可致变异性。臭氧灭菌法中臭氧穿透力弱, 而且其杀菌效果受温度和湿度影响较大。紫外照射灭菌法穿透力弱, 对物料化学成分影响小, 无残留。<sup>60</sup>Co辐照灭菌法穿透力强, 可对包装完整的药品进行辐照, 常温灭菌, 灭菌后样品温度变化不大, 但缺点是辐照后样品成分会发生一定的变化<sup>[2]</sup>。

天楼解毒消肿散为传统民间验方, 由重楼、拳参、山柰、冰片等中药组成, 具有清热解暑、消肿止血的功效, 用于热毒壅滞、气滞血瘀所致疔痈, 临床以散剂形式外敷患处, 疗效显著。方中重楼为君药, 2010年版《中国药典》(一部)以重楼皂

苷 I、II、VI、VII 的含量作为其质量控制指标。为达到 2010 年版《中国药典》(一部)规定的微生物限度标准, 拟采用紫外灭菌法和<sup>60</sup>Co辐照灭菌法对天楼解毒消肿散的灭菌方法进行比较研究, 以灭菌效果和重楼皂苷 I、II、VI、VII 的含量作为评价指标, 筛选合适的灭菌方法, 为天楼解毒消肿散的生产灭菌工艺提供依据<sup>[3]</sup>。

## 1 材料

### 1.1 仪器

<sup>60</sup>Co 辐照源(湖北省农科院辐照中心); ZXQ-60W 型紫外灭菌装置(武汉平安医疗器械有限公司); SW-CF-IB 型净化工作台(苏州净化设备厂); Waters 600 型高效液相色谱仪, 包括 Waters 600 控制面板、Waters 2996 二极管阵列检测器、Waters 600 四元泵、Waters 脱气机(美国 Waters 公司); UPT-11-10T 型净化水机(成都超纯科技有限公司)。

### 1.2 饮片

重楼、制天南星、拳参、山柰、樟脑(批号分别为 20121201、20121201、20121201、20121202、20121201)饮片均购自武汉市恒成医药有限责任公司, 经湖北省中医院陈树和主任药师鉴定为真品。

△ 基金项目: 湖北省科技计划项目(No.2014BKB082)

\* 硕士研究生。研究方向: 中药及其制剂的物质基础。E-mail: 531869732@qq.com

# 通信作者: 主任药师, 硕士生导师。研究方向: 中药物质基础、医院制剂。电话: 027-88929176。E-mail: chenshuhe606@163.com

### 1.3 药品与试剂

天楼解毒消肿散(湖北省中医院制剂中心,批号:20130218、20130220、20130222,规格:30 g/瓶);重楼皂苷 I 对照品(批号:111590-201103,纯度:92.1%)、重楼皂苷 II 对照品(批号:111591-201103,纯度:93.4%)、重楼皂苷 VI 对照品(批号:111592-201203,纯度:95.1%)、重楼皂苷 VII 对照品(批号:111593-201303,纯度:92.5%)均购自中国食品药品检定研究院;营养琼脂培养基(批号:1305223)、玫瑰红钠琼脂培养基(批号 130523)均购自北京三药科技开发公司;乙腈为色谱纯,水为超纯水,其余试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

### 2.1 不同灭菌方法的灭菌效果比较

2.1.1  $^{60}\text{Co}$  辐照灭菌<sup>[4-5]</sup> 取3批天楼解毒消肿散,分装于固体药用聚丙烯瓶中(每瓶装量30 g),置于 $^{60}\text{Co}$  辐照灭菌装置中,每间隔4 h 辐照1次,每次辐照1 h,辐照吸收剂量为1 kGy,辐照3次,取样检验。

2.1.2 紫外照射灭菌<sup>[6]</sup> 取3批天楼解毒消肿散,每批30 g,均匀置于培养皿中(厚度不超过0.6 cm),每10 m<sup>2</sup>用一只40 W 紫外灯照射,灯距物料2.5 m 左右[室温,相对湿度(50% ± 5%)],照射2 h后,取样检验。

2.1.3 微生物限度检验及结果 分别取上述两种方法灭菌后的天楼解毒消肿散样品,按2010年版《中国药典》(一部)附录X III C 微生物限度检查法检验,结果见表1。

表1 两种灭菌方法微生物限度检查结果

Tab 1 Results of microbial limit test by 2 kinds of sterilization methods

批号	$^{60}\text{Co}$ 辐照灭菌				紫外照射灭菌			
	细菌数, CFU/g	霉菌和酵母菌数, CFU/g	金黄色葡萄球菌	铜绿假单胞菌	细菌数, CFU/g	霉菌和酵母菌数, CFU/g	金黄色葡萄球菌	铜绿假单胞菌
20130218	350	0	未检出	未检出	>10 <sup>2</sup>	>10 <sup>2</sup>	未检出	未检出
20130220	290	0	未检出	未检出	>10 <sup>2</sup>	>10 <sup>2</sup>	未检出	未检出
20130222	380	20	未检出	未检出	>10 <sup>2</sup>	>10 <sup>2</sup>	未检出	未检出

由表1可知,3批天楼解毒消肿散样品经 $^{60}\text{Co}$  射线辐照灭菌后,细菌数、霉菌和酵母菌数、金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌均符合《中国药典》规定,而紫外线照射灭菌样品细菌数、霉菌和酵母菌数不符合《中国药典》规定。

### 2.2 不同灭菌方法对样品含量的影响<sup>[7-11]</sup>

2.2.1 色谱条件 色谱柱:Agilent Zorbax SB-C<sub>18</sub>(150 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈(A)-水(B)梯度洗脱(0~10 min, A 30% → 40%; 10~20 min, A 40% → 42%; 20~30 min, A 42% → 60%; 30~40 min, A 60% → 40%; 40~45 min, A 40% → 30%);流速:0.8 ml/min;检测波长:203 nm;柱温:25 ℃;进样量:10 μl。在此条件下,取重楼皂苷样品、对照品、阴性对照品进样溶液分析。供试品色谱中重楼皂苷 I、重楼皂苷 II、重楼皂苷 VI、重楼皂苷 VII 色谱峰与相邻色谱峰可达基线分离(分离度 ≥ 1.5),阴性对照色谱无干扰。色谱见图1。

2.2.2 对照品溶液的制备 分别精密称定重楼皂苷 I 7.45 mg、重楼皂苷 II 2.15 mg、重楼皂苷 VI 25.05 mg、重楼皂苷 VII 3.05 mg 置于10 ml 量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,即得混合对照品贮备溶液。精密量取混合对照品贮备溶液0.2、0.5、0.8、1.0、1.2、1.5 ml,置于2 ml 量瓶中,加甲醇稀释至刻

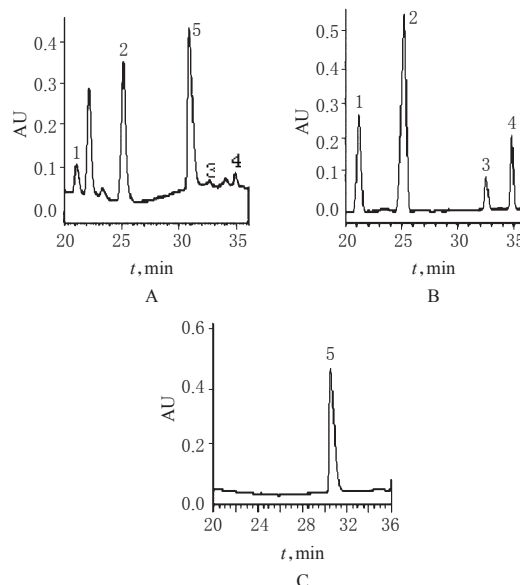


图1 高效液相色谱图

A. 样品; B. 对照品; C. 阴性对照品; 1. 重楼皂苷 VII; 2. 重楼皂苷 VI; 3. 重楼皂苷 II; 4. 重楼皂苷 I; 5. 杂质峰

Fig 1 HPLC chromatograms

A. sample; B. reference; C. negative reference; 1. polyphyllin VII; 2. polyphyllin VI; 3. polyphyllin II; 4. polyphyllin I; 5. impurity peak

度,摇匀,即得含重楼皂苷 I 0.074 5、0.186 25、0.298 0、0.372 5、0.447 0、0.558 8 mg/ml,重楼皂苷 II 0.021 5、0.053 8、0.086 0、0.107 5、0.129 0、0.161 2 mg/ml,重楼皂苷 VI 0.250 5、0.626 25、1.002 0、1.252 5、1.503 0、1.878 8 mg/ml,重楼皂苷 VII 0.030 5、0.076 2、0.122 0、0.152 5、0.183 0、0.228 8 mg/ml 的混合对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液的制备 取天楼解毒消肿散粉末2.0 g,精密称定,置于具塞锥形瓶中,精密加入70%乙醇50 ml,称定质量,超声处理45 min,放冷至室温,再称定质量,用70%乙醇补足减失的质量,摇匀,滤过;取续滤液25 ml,水浴蒸干,残渣加70%乙醇溶解并定容至2 ml,0.45 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液作为供试品溶液。

2.2.4 阴性对照溶液的制备 按处方比例取缺重楼的其余中药饮片,照天楼解毒消肿散的制法组成阴性样品。取阴性样品1.5 g,照“2.2.3”项下方法制成缺重楼的阴性对照溶液。

2.2.5 线性关系考察 分别精密吸取上述混合对照品溶液10 μl,依次注入高效液相色谱仪,测定各成分的色谱峰面积。以对照品质量浓度(x, μg/μl)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归,得重楼皂苷 I、II、VI、VII 的回归方程分别为 y = 727.94x - 37.571 (r = 0.999 6)、y = 505.32x - 16.761 (r = 0.999 6)、y = 414.26x - 229.07 (r = 0.999 6)、y = 543.11x - 72.478 (r = 0.999 8)。结果表明,重楼皂苷 I、II、VI、VII 质量浓度分别在0.074 5~0.745 0、0.021 5~0.215 0、0.250 5~2.505 0、0.030 5~0.305 0 μg/μl 范围内线性关系良好。

2.2.6 精密度试验 精密吸取混合对照品贮备溶液10 μl,按“2.2.1”项下色谱条件连续进样6次,测定峰面积。结果重楼皂苷 I、II、VI、VII 峰面积的RSD分别为1.25%、1.42%、1.62%、1.89% (n = 6),表明仪器精密度良好。