

不同灭菌法对婴儿健脾散成分及微生物的影响

本文目的在于优选最佳灭菌方法，保证婴儿健脾散中木香、白术、牛黄药材有效成分的鉴别，确保卫生学合格——通过采用薄层色谱法测定不同灭菌方法（包括湿热蒸气灭菌法、高温瞬时灭菌法）处理的木香药材和婴儿健脾散中木香烃内酯，进而将二者进行鉴别，旨在为改进生产工艺提供参考。

文 / 李振豪，李顺仓，王杰，石梦花，乔晓芳

中药材及中成药的灭菌是保证中药临床安全的必要条件，不同的灭菌方法对中药材及中成药中有效成分的影响不同，常见的灭菌方法有微波灭菌、加湿微波灭菌、湿热蒸气灭菌以及钴 60 灭菌等。这些方法都因“热”“湿”或“辐射”残留等问题，造成中药活性成分的改变或残留一些毒性物质。在国家卫生管理部门加强对中药辐照、微波灭菌的监管下，中药散剂的性状、鉴别项、卫生学的质量控制已经成为实现中药现代化生产的瓶颈。为验证不同灭菌方法对中药材及中成药中有效成分的影响，本研究选择了婴儿健脾散作为实验用中成药，并对其主

要组成中药材进行研究，以期寻找最佳的灭菌方法，为婴儿健脾散的灭菌方法的选择提供参考依据。

婴儿健脾散为《中华人民共和国卫生部药品标准·中药成方制剂》（第六册）收载的儿科用药制剂品种之一，由白扁豆、牛黄、鸡内金、木香、白术、川贝母等 7 味中药组成。功能主治：健脾、消食、止泻。用于消化不良、乳食不进、腹痛腹泻。本实验选择木香^[1]、白术^[2]、牛黄为研究药材。木香为常用中药，功能行气止痛，且能健脾和胃，木香烃内酯^[3](Costunolide)是木香的主要活性成分，为木香质量控制的主要指标。同时其活性成分具有解痉、松弛平滑肌的作用，能保护胃粘膜，抑制溃疡，并且均有明显的利胆等作用。白术为常用中药，炒制后功能以健脾止泻为胜，主要成分为苍术酮和白术内酯两种成分，在抗胃溃疡、抗痴呆、抗肿瘤、抗炎以及抗糖尿病等方面

起作用。牛黄为牛科动物牛(Bos taurus domesticus Gmelin)的干燥胆结石，有着清心、豁痰、开窍、凉肝、息风以及解毒的功效。牛黄所含的胆酸、去氧胆酸对肠平滑肌的作用是其所含各成分的综合作用。总体表现而言，主要呈现为抑制平滑肌的解痉作用。故这三味药材是婴儿健脾散中对健脾、消食、止泻有调节作用的重要药味。本文利用薄层色谱法通过对高温瞬时灭菌方法的婴儿健脾散原粉中的中木香、白术、牛黄进行了 TLC 比较，考察高温瞬时灭菌方法对木香、白术、牛黄进行鉴别项的影响，为婴儿健脾散质量标准 and 生产工艺的完善提供参考。

1 实验材料与仪器

1.1 实验材料

婴儿健脾散样品（原药材粉碎后与牛黄混合药粉）；白术对照药材、牛黄对照药材、胆酸、猪去氧胆酸对照品、去氢木香内酯

PROCESS-Tip
* 更多信息请登录：
pharm.vogel.com.cn
* 反馈编码：200656

本文作者李振豪、李顺仓以及王杰就职于河南信心药业有限公司；石梦花就职于白云山汤阴东泰药业有限责任公司；乔晓芳就职于河南省食品药品审评查验中心。审稿人王建涛系河南省医药技师学院制药工程系主任，高级实习指导教师。

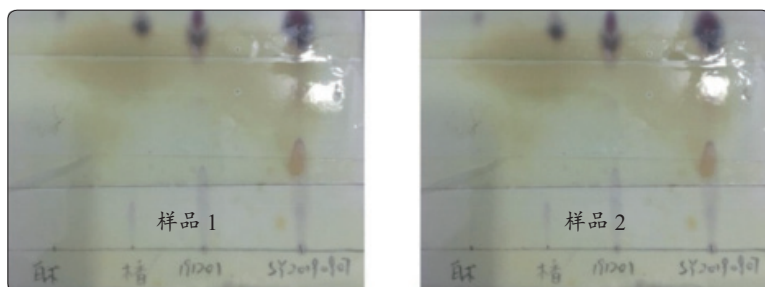


图1 白术在与对照药材色谱相应的位置上，显相同颜色的明显斑点，并显有一桃红色主斑点（苍术酮）

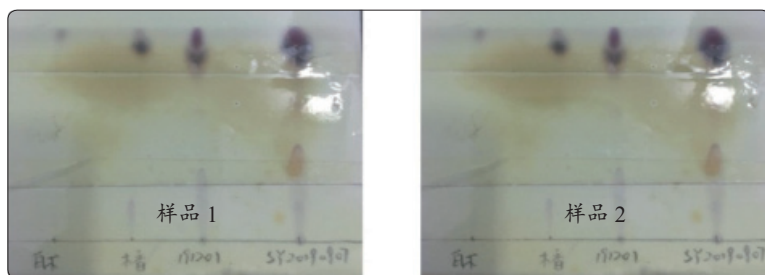


图2 木香在与对照品色谱相应的位置上，显相同颜色的明显斑点

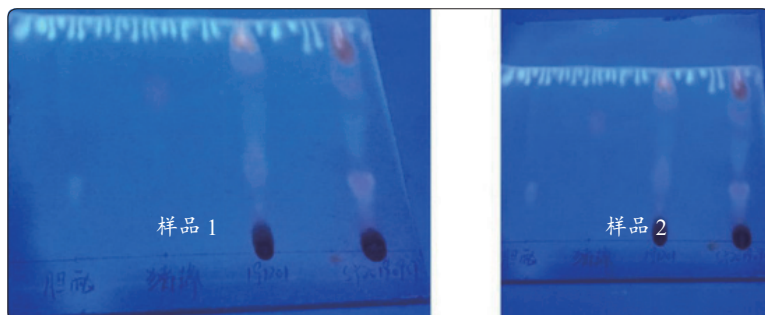


图3 牛黄在与对照品色谱相应的位置上，显相同颜色明显的荧光斑点

对照品、木香烃内酯对照品（中国药品生物制品检定所）；所用试剂均为分析纯。

1.2 仪器

MJX-250B-Z 型霉菌培养箱、SPX-250B-Z 型生化培养箱（上海博讯实业有限公司医疗设备厂）；硅胶 G（青岛海洋化工厂）。

2 方法与结果

2.1 药材处理

取试验批号为 SY20190907、191201 批次的婴儿健脾散原药材适量，粉碎成细粉，过 120 目筛，将细粉混合均匀。取灭菌前样品，作为样品 1，其余的原粉作为样品 2，置高温瞬时灭菌柜中，170℃ 灭

菌 5 s。

2.2 薄层色谱鉴别^[4]

2.2.1 白术薄层色谱鉴别

取白术粉末 0.5 g，加正己烷 2 mL，超声处理 15 min，过滤，取滤液作为供试品溶液。另取白术对照药材 0.5 g，同法制成对照药材溶液。照薄层色谱法^[5]（通则 0502）试验，吸取上述新制备的两种溶液各 10 μL，分别点于同一硅胶 G 薄层板上，以石油醚（60 ~ 90℃）-乙酸乙酯（50 : 1）为展开剂，经展开、取出、晾干，喷以 5% 香草醛硫酸溶液，加热至斑点显色清晰。供试品色谱中，在与对照药材色谱相应的位置上，显相同颜色的斑点，并应显有一桃红色主斑点（苍



无论您面临何种工况，
我们承诺为您提供完善的阀门应用及解决方案！

英国 FLYGER 弗莱戈阀门作为世界领先的阀门制造商，始终秉承“阀门应用专家，有价值的服务”的价值服务理念；关注并深刻理解客户需求，针对性定制生物制药行业阀门应用及解决方案；为用户提供高品质阀门产品和专业的流体控制解决方案。不断以卓越的产品和服务成就 FLYGER 和客户的共同价值生态。

球阀 蝶阀 调节阀 隔膜阀 止回阀 截止阀 闸阀
刀闸阀 陶瓷阀 衬氟阀 执行机构 特殊定制阀门



销售总部
地址：上海市七莘路1839号
财富108广场北楼20层
电话：+86-21-60712361
传真：+86-21-60712363
邮箱：flygersh@flyger.cn



官方网站

成都工厂
地址：成都市经济技术开发区
（龙泉驿）南二路309号
电话：+86-28-88428198
传真：+86-28-85151711
邮箱：flyger@flyger.cn



微信公众号

阀门应用专家 有价值的服务

广告

术酮)。如图 1 所示。

2.2.2 木香薄层色谱鉴别

取木香粉末 0.5 g，加甲醇 10 mL，超声处理 30 min，过滤，取滤液作为供试品溶液。另取去氢木香内酯对照品、木香烃内酯对照品，加甲醇分别制成每 1 mL 含 0.5 mg 的溶液，作为对照品溶液。照薄层色谱法（通则 0502）试验，吸取上述 3 种溶液各 5 μ L，分别点于同一硅胶 G 薄层板上，以环己烷 - 甲酸乙酯 - 甲酸（15:5:1）的上层溶液为展开剂，经展开、取出、晾干，喷以 1% 香草醛硫酸溶液，加热至斑点显色清晰。供试品色谱中，在与对照品色谱相应的位置上，显相同颜色的斑点。如图 2 所示。

2.2.3 牛黄薄层色谱鉴别

取牛黄粉末 10 mg，加三氯甲烷 20 mL，超声处理 30 min，过滤，滤液蒸干，残渣加乙醇 1 mL 使之溶解，作为供试品溶液。另取胆酸对照品、去氧胆酸对照品，加乙醇制成每 1 mL 各含 2 mg 的混合溶液，作为对照品溶液。照薄层色谱法（通则 0502）试验，吸取上述两种溶液各 2 μ L，分别点于同一硅胶 G 薄层板上，以异辛

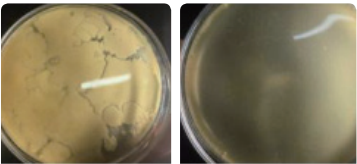


图 4 需氧菌

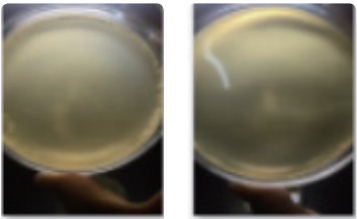


图 5 霉菌和酵母菌总数

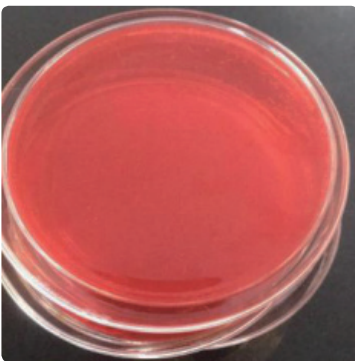


图 6 大肠埃希菌

烷 - 乙酸乙酯 - 冰醋酸（15 : 7 : 5）为展开剂，经展开、取出、晾干，喷以 10% 硫酸乙醇溶液，在 105℃ 加热至斑点显色清晰，置紫外光灯（365 nm）下检视。供试品色谱中，在与对照品色谱相应的位置上，显相同颜色的荧光斑点。如图 3 所示。

2.3 需氧菌总数、霉菌和酵母菌总数、大肠埃希菌、耐胆盐革兰阴性菌、沙门菌的测定^[3]

2.3.1 需氧菌总数、霉菌和酵母菌总数测定

2.3.1.1 供试液的制备

称取供试品 10 g，加 pH 为 7.0 的无菌氯化钠 - 蛋白胨缓冲液至 100 mL，用匀浆仪或其他有效的方法，混匀，作为 1:10 供试液。

2.3.1.2 供试液的释稀

取 3 ~ 4 支灭菌试管，分别加入 9 mL、pH 为 7.0 的无菌氯化钠 - 蛋白胨缓冲液灭菌稀释剂。加完稀释剂后，试管塞应立即塞上。另取 1 支 1 mL 灭菌吸管吸取 1:10 均匀供试液 1 mL，加入装有 9 mL、pH 为 7.0 无菌氯化钠 - 蛋白胨缓冲液灭菌稀释剂的试管中，混匀，即为 1:100 供试液。

2.3.1.3 供试品的检查

在进行 10 倍递增稀释的同时，以该稀释级吸管，吸取该稀释液各 1 mL 至每个直径为 90 mm 的灭菌平皿中，或从高稀释级

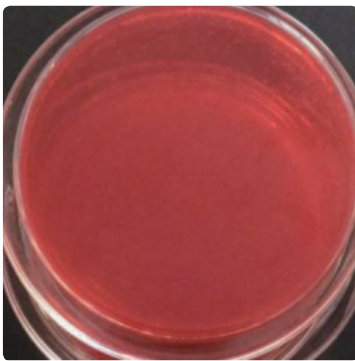


图 7 耐胆盐革兰阴性菌

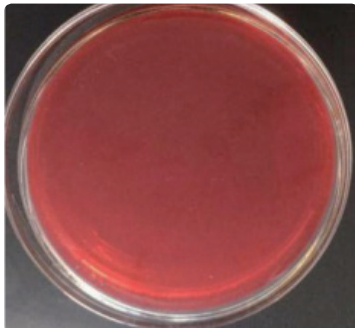


图 8 沙门菌

至低稀释级吸液时可用 1 支吸管吸供试液各 1 mL 至每个灭菌平皿中。每一稀释级每种培养基注 2 ~ 3 个平皿，注平皿时，将 1 mL 供试液慢慢全部注入平皿中，管内无残留液体，防止回流到吸管尖端部。

阴性对照：待各级稀释液注皿完毕后，用 1 支 1 mL 吸管吸取稀释液（pH 为 7.0 的无菌氯化钠 - 蛋白胨缓冲液）各 1 mL，分别注入 4 个平皿中。其中 2 个作细菌数阴性对照；另 2 个作霉菌、酵母菌数阴性对照。

倾注培养基：将预先配制好的培养基（细菌计数用胰酪大豆胨琼脂培养基，霉菌、酵母菌计数的沙氏葡萄糖琼脂培养基）溶化，冷至约 45℃ 时，倾注上述各个平皿约 15 ~ 20 mL，以顺时针或逆时针方向快速旋转平皿，使供试液或稀释液与培养基混匀，置操作平台上待凝。混匀时切勿

将培养基溅到皿边及皿盖上。

2.3.1.4 菌落培养

需氧菌计数平板倒置于30~35℃培养箱中培养5天。霉菌、酵母菌计数平板于20~25℃培养箱中培养7天,点计平板菌落数。

2.3.1.5 菌落计数

将平板置菌落计数器上或从平板的背面直接以肉眼点计,以透射光衬以暗色背景,仔细观察。需氧菌如图4所示,霉菌、酵母菌如图5所示。

2.3.2 大肠埃希菌的测定

2.3.2.1 取样量

取样品稀释液10 mL加入100 mL增菌培养液中混匀,作为1:10供试液。

2.3.2.2 菌落培养

选择培养:将供试液加入预先配制好的胰酪大豆胨液体培养基,置于30~35℃培养箱中培养18~24 h;将上述培养的培养物1 mL,接种于100 mL麦康凯液体培养基中,置于42~44℃培养箱中培养24~48 h。

分离培养:取麦康凯液体培养物划线接种于麦康凯琼脂培养基平板上,置于30~35℃培养箱中培养24~48 h。如图6所示。

2.3.3 耐胆盐革兰阴性菌的测定

2.3.3.1 取样量

取含适量(不少于10 mL)胰酪大豆胨液体培养基管3支中分别加入1 mL不同比例的样品稀释液。样品稀释倍数1:10/1:100/1:1000供试液。

2.3.3.2 菌落培养

增菌培养:将供试液加入预先配制好的胰酪大豆胨液体培养基,置于20~25℃培养箱中培养2 h。

分离培养:将供试液加入预

先配制好的肠道菌增菌液体培养基,置于30~35℃培养箱中培养24~48 h。

纯培养:将供试液加入预先配制好的紫红胆盐葡萄糖琼脂液体培养基,置于30~35℃培养箱中培养18~24 h。如图7所示。

2.3.4 沙门菌的测定

2.3.4.1 供试液制备和增菌培养

称取供试品10 g直接或处理后接种至适宜体积(经方法适用性试验确定的)胰酪大豆胨液体培养基中。

2.3.4.2 菌落培养

增菌培养:将供试液加入预先配制好的胰酪大豆胨液体培养基,置于30~35℃培养箱中培养18~24 h。

选择培养:取上述预培养的培养物0.1 mL,接种于10 mL RV沙门增菌液体培养基中,取少量RV沙门增菌液体培养物划线接种于赖氨酸脱氧胆酸盐琼脂培养基平板上,置于30~35℃培养箱中培养18~48 h。如图8所示。

2.3.5 菌数报告规则

需氧菌总数测定宜选取平均菌落数小于300 cfu的稀释级、霉菌和酵母菌总数测定宜选取平均菌落数小于100 cfu的稀释级,作为菌数报告的依据。取最高的平均菌落数,计算1 g、1 mL或10 cm²供试品中所含的微生物数,取两位有效数字报告。如各稀释级的平板均无菌落生长,或仅最低稀释级的平板有菌落生长,但平均菌落数小于1时,则以<1乘以最低稀释倍数的值报告菌数。

3 结果分析

从试验结果直观分析来观察,图1所示白术在与对照药材色谱

相应的位置上,显相同颜色的明显斑点,并显有一桃红色主斑点(苍术酮)。图2所示木香在与对照品色谱相应的位置上,显相同颜色的明显斑点。图3所示牛黄在与对照品色谱相应的位置上,显相同颜色明显的荧光斑点。微生物检测经计数,图4所示需氧菌、图5所示霉菌和酵母菌总数、图6所示大肠埃希菌、图7所示耐胆盐革兰阴性菌、图8所示沙门菌符合《中国药典》(2015版)微生物限度标准。

4 小结

实验结果表明,中药散剂在经过使用170℃过热蒸汽,灭菌时间5 s,婴儿健脾散中的白术、木香及牛黄天然成分的完整性、稳定性未发生明显改变,并且以纯化水作为介质产生过热蒸汽对散剂灭菌不会产生毒素和未知物。生产中使用过热蒸汽瞬时灭菌设备,解决了中药传统灭菌引起的天然成分变性、结块、微生物检测不稳定等各种弊端,而且能连续、快速彻底灭杀原粉中的致病菌,将需氧菌限度有效控制在较低的范围,能够有效地保证婴儿健脾散中的质量控制目标,突破了中药散剂现代化生产灭菌环节的瓶颈。

【参考文献】

- [1] 徐国均,徐珞珊.中药材粉末显微鉴定[M].京:人民卫生出版社,1986.
- [2] 陈俊华,舒光明.中药粉末显微鉴别手册(第二卷)[M].四川省中药研究所,1986.
- [3] 中华人民共和国药典(一部)[S].北京:化学工业出版社,2015.附录VIB.
- [4] 王宝栗.中成药质量标准与标准物质研究[M].北京:中国医药科技出版社,1994.
- [5] 康廷国.中成药薄层色谱鉴别[M].北京:人民卫生出版社.