

- influenza caused by A/duck/Novosibirsk/56/05 (H5N1) (influenza A virus, alpha influenza virus, orthomyxoviridae) [J]. *Vopr Virusol*, 2019, 64(6): 268-273.
- [7] Li B J, Rui J Q, Ding X J, et al. Exploring the multicomponent synergy mechanism of Banxia Xiexin Decoction on irritable bowel syndrome by a systems pharmacology strategy [J]. *J Ethnopharmacol*, 2019, 233: 158-168.
- [8] 翟志光. 甲型H1N1流感的中医诊疗规律研究[J]. 山西中医学院学报, 2012, 13(6): 23-26.
- [9] Marchant D, Singhera G K, Utokaparch S, et al. Toll-like receptor 4-mediated activation of p38 mitogen-activated protein kinase is a determinant of respiratory virus entry and tropism [J]. *J Virol*, 2010, 84: 11359-11373.
- [10] 杜海霞, 万海同, 何 显, 等. 银花平感颗粒的体外抗甲型H1N1流感病毒作用[J]. 中医杂志, 2017, 58(23): 2039-2044.
- [11] Peng X Q, Zhou H F, Zhang Y Y, et al. Antiviral effects of Yinhuapinggan granule against influenza virus infection in the ICR mice model [J]. *J Nat Med*, 2016, 70(1): 75-88.
- [12] Peiris J S M, Hui K P Y, Yen H L. Host response to influenza virus: protection versus immunopathology [J]. *Curr Opin Immunol*, 2010, 22(4): 475-481.
- [13] Peng X Q, Zhou H F, Lu Y Y, et al. Protective effects of Yinhuapinggan granule on mice with influenza viral pneumonia [J]. *Int Immunopharmacol*, 2016, 30: 85-93.
- [14] Peterfi L, Yusenko M V, Kovacs G. IL6 shapes an inflammatory microenvironment and triggers the development of unique types of cancer in end-stage kidney [J]. *Anticancer Res*, 2019, 39(4): 1869-1874.
- [15] Parvez M K, Alam P, Arbab A H, et al. Analysis of antioxidative and antiviral biomarkers β -amyrin, β -sitosterol, lupeol, ursolic acid in *Guiera senegalensis* leaves extract by validated HPTLC methods [J]. *Saudi Pharm J*, 2018, 26(5): 685-693.
- [16] 彭学谦, 何 显, 周惠芬, 等. 银花平感颗粒体内抗甲型H1N1流感病毒作用[J]. 中国中药杂志, 2015, 40(19): 3845-3850.
- [17] 杜海霞, 周惠芬, 何 显, 等. 银花平感颗粒和三拗汤体内结合对甲型流感病毒的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2019, 39(2): 223-229.

买朱尼制剂中没食子、儿茶灭菌方法的筛选

李建梅, 吐鲁洪·卡地尔, 希尔艾力·吐尔逊*

(新疆维吾尔自治区维吾尔医药研究所, 新疆维吾尔医方剂学重点实验室, 新疆 乌鲁木齐 830011)

摘要: 目的 筛选买朱尼制剂中没食子、儿茶的灭菌方法。方法 分别采用干热、湿热、热压、脉冲式、钴-60辐射对买朱尼制剂中没食子、儿茶进行灭菌处理, 检测灭菌前后的微生物限度指标, HPLC法测定灭菌前后没食子酸、儿茶素含量。该药物甲醇提取物的分析采用 Waters XBridge Shield RP C₁₈色谱柱 (4.6 mm×250 mm, 5 μ m); 流动相甲醇-0.2%甲酸, 梯度洗脱; 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 35 °C; 检测波长 254 nm。结果 没食子酸、儿茶素在各自范围内线性关系良好 ($r>0.999$)，平均加样回收率 (RSD) 分别为 101.46% (1.71%)、100.96% (1.46%)。钴-60辐射灭菌、干热灭菌、热压灭菌、脉冲式灭菌效果均较好, 其中钴-60辐射灭菌对没食子酸、儿茶素含量影响最小。结论 该方法稳定准确, 重复性好, 适用于买朱尼制剂的质量评价。含没食子酸、儿茶素类的药材可选用钴-60辐射进行灭菌。

关键词: 买朱尼制剂; 灭菌方法; 没食子; 儿茶; 没食子酸; 儿茶素; HPLC

中图分类号: R284.2

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2023)03-1003-04

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2023.03.054

收稿日期: 2021-01-27

基金项目: 新疆维吾尔自治区自然科学基金项目 (2019D01A77); 新疆维吾尔自治区公益性科研院所项目 (ky2019095)

作者简介: 李建梅 (1982—), 女, 硕士, 研究方向为药物制剂与分析。Tel: (0991) 2565663, E-mail: 85762226@qq.com

*通信作者: 希尔艾力·吐尔逊(1971—), 男 (维吾尔族), 博士, 研究员, 研究方向为维吾尔药新药开发。E-mail: xirlion@126.com

网络出版日期: 2022-08-23

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.1368.R.20220822.1616.002.html>

灭菌是中药制药过程的关键环节，直接影响着药品质量^[1-2]，根据新药申报要求，制剂在申报过程中需对药材灭菌方式进行考察，目前常用手段包括脉冲式、热压、湿热、干热、辐照灭菌^[3-6]等。维吾尔药中蜜膏剂、丸剂、散剂等传统剂型占比较高，均是将药材直接粉碎入药，而且目前维吾尔医临床大部分院内制剂仍然保持传统剂型特点，故灭菌方法对其质量控制尤为关键。本实验选择课题组前期研究的买朱尼制剂中没食子、儿茶，对不同灭菌方法下灭菌前后药材粉末中微生物限度^[7-9]及没食子酸、儿茶素含量进行比较，筛选灭菌方法，以期为维吾尔医药制剂生产工艺完善提供参考，为含没食子酸和儿茶素类成分的其他药材灭菌方法研究提供实验依据，也为保持维吾尔医临床用药的需求和制剂申报的要求提供参考数据。

1 材料

1.1 仪器 Waters e2695 型高效液相色谱仪、Waters 2489型二极管阵列检测器、Empower 3 数据采集系统、XBridge Shield RP C₁₈ 色谱柱（美国 Waters 公司）；SECURA3102-1CN 型、SECURA124-1CN 型电子天平（德国 Sartorius 公司）；SK3200HP 型超声波清洗仪（上海科导超声仪器有限公司）；DFT-200 型手提式高速万能粉碎机（温岭市林大机械有限公司）；LDZX-75KBS 型立式压力蒸汽灭菌器（上海申安医疗器械厂）；钴 60 辐照灭菌设备（中国科学院理化技术研究所辐射中心）。

1.2 试剂与药物 没食子酸（批号 110831-201204）、儿茶素（批号 887-2001）对照品均购自中国食品药品检定研究院。买朱尼制剂中药材粉末由新疆维吾尔自治区维吾尔医药研究所药剂学研究室自制。甲醇、乙腈为色谱纯（美国 Sigma 公司）；磷酸、甲酸为色谱纯（天津光复精细化工研究所）。

2 方法与结果

2.1 灭菌方法与条件 根据文献[10-12]报道，灭菌方法及条件分别为热压灭菌（121℃，15 min）、钴 60 辐照灭菌（8 kGy）、湿热灭菌（100℃，15 min）、干热灭菌（140℃电热灭菌器，45 min）、脉冲式灭菌（105℃，75 min）。

2.2 性状特征评价 药材粉末均为棕黄色粉末，气微香，并且仅钴 60 照射后其性状未发生改变，具体见表 1。

表 1 不同灭菌方法下药材性状

灭菌方法	色泽	形状特征	气味
灭菌前	棕黄色	粉末	微香
脉冲式灭菌	深棕色	结块	无味
热压灭菌	深棕色	结块	无味
钴-60 辐射灭菌	浅棕色	粉末	无味
湿热灭菌	深棕色	结块	无味
干热灭菌	深棕色	结块	无味

2.3 微生物限度测定 根据微生物学方法学验证方法进行细菌数、霉菌和酵母菌数、大肠埃希菌、大肠菌群检查，发现除湿热灭菌后的细菌总数超标外，其他灭菌方法均达标，具体见表 2。

表 2 微生物限度检查结果

灭菌方法	细菌总数/ (cfu·g ⁻¹)	霉菌和酵母菌 数/(cfu·g ⁻¹)	大肠埃希 菌/g	大肠菌 群/g
灭菌前	74 000	120	未检出	<10
脉冲式灭菌	<100	<10	未检出	<10
热压灭菌	<100	<10	未检出	<10
湿热灭菌	25 000	<10	未检出	<10
干热灭菌	<100	<10	未检出	<10
钴-60 辐射灭菌	<100	<10	未检出	<10

2.4 含量测定

2.4.1 色谱条件 参考文献[13-16]报道，Waters XBridge Shield RP C₁₈ 色谱柱（4.6 mm×250 mm, 5 μm）；流动相甲醇（A）-0.2% 甲酸（B），梯度洗脱（0~7 min, 10% A；7~8 min, 10%~20% A；8~17 min, 20% A）；体积流量 1.0 mL/min；柱温 35℃；检测波长 254 nm；进样量 10 μL。

2.4.2 溶液制备

2.4.2.1 对照品溶液 精密称取没食子酸对照品适量，置于 25 mL 棕色量瓶中，甲醇制成质量浓度为 0.424 mg/mL，精密量取 2.0 mL，甲醇定容至 10 mL，即得（0.084 8 mg/mL）。精密称取儿茶素对照品适量，置于 25 mL 棕色量瓶中，甲醇制成质量浓度为 0.404 mg/mL，精密量取 6.2 mL，甲醇定容至 10 mL，即得（0.250 mg/mL）。

2.4.2.2 供试品溶液 取 0.1 g 本品，20 mL 甲醇超声处理 30 min，定容至 25 mL，精密量取 2 mL，甲醇定容至 10 mL，0.45 μm 微孔滤膜过滤，即得。

2.4.2.3 阴性样品溶液 按处方制备缺没食子酸、儿茶素的阴性样品，药材混合粉碎，过 100 目筛。按“2.4.2.2”项下方法制备，即得。

2.4.3 线性关系考察 分别精密吸取“2.1.2.1”项下 2 种对照品溶液 2.0、4.0、6.0、8.0、10.0、12.0 μL，在“2.4.1”项色谱条件下进样测定 6 次。以进样量为横坐标（X），峰面积为纵坐标（Y）进行回归，得没食子酸方程为 $Y = 2730.827.91X - 91762.73$ ($r = 0.999\ 8$)，儿茶素方程为 $Y = 608.986X - 76310$ ($r = 0.999\ 9$)，分别在 0.169 6~1.017 6、0.500~3.000 μg 范围内线性关系良好。

2.4.4 专属性考察 取对照品、供试品、阴性样品溶液各 10 μL，在“2.4.1”项色谱条件下进样测定，结果见图 1。由此可知，没食子酸、儿茶素峰形良好，分离度均大于 1.5，理论板数均大于 4 000，阴性无干扰，表明该方法专属性良好。

2.4.5 精密度试验 分别精密吸取“2.1.2.1”项下 2 种对照品溶液 3.0 mL，置于 10 mL 量瓶中，甲醇定容至 10 mL，混匀（没食子酸、儿茶素质量浓度分别为 25.44、75.00 mg/mL），在“2.4.1”项色谱条件下进样测定 6 次，测得没食子酸、儿茶素峰面积 RSD 分别为 1.55%、0.95%，表明仪器精密度良好。

2.4.6 重复性试验 精密吸取同一份供试品溶液适量，在“2.4.1”项色谱条件下进样测定，测得没食子酸、儿茶素

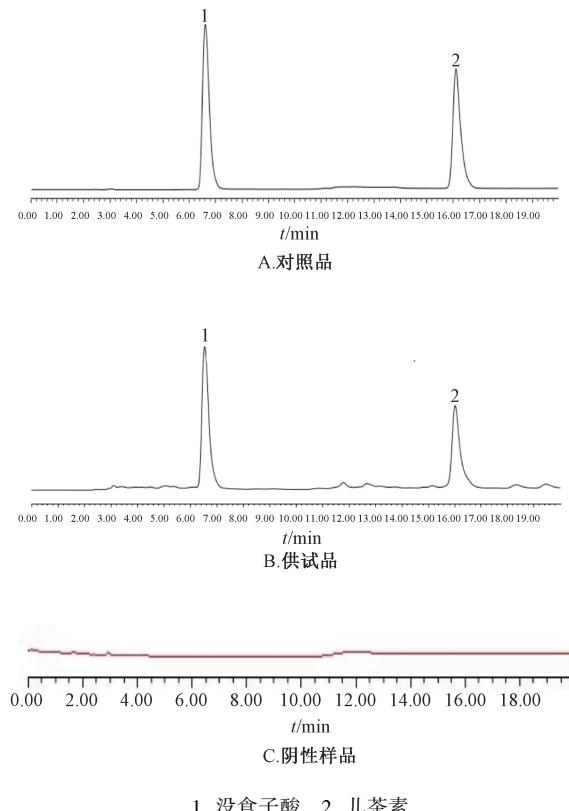


图1 各成分HPLC色谱图

峰面积 RSD 分别为 0.57%、1.49%，表明该方法重复性良好。

2.4.7 稳定性试验 精密吸取同一份供试品溶液适量，于 0、2、4、6、8、12 h 在“2.4.1”项色谱条件下进样测定，测得没食子酸、儿茶素峰面积 RSD 分别为 1.16%、1.69%。表明溶液在 12 h 内稳定性良好。

2.4.8 加样回收率试验 精密称取各成分含量已知的供试品溶液 6 份，每份 0.05 g，定容至 25 mL 量瓶中，加入 0.424 mg/mL 没食子酸对照品溶液 2.0 mL，0.404 mg/mL 儿茶素对照品溶液 4.0 mL，按“2.4.2.2”项下方法制备供试品溶液，在“2.4.1”项色谱条件下进样测定，计算回收率，结果见表 3。

2.5 灭菌前后含量比较 由表 4 可知，湿热、钴-60 辐射灭菌后没食子酸含量无明显变化，脉冲式灭菌后其含量明显降低，热压、干热灭菌后其含量有所升高；湿热、钴-60 辐射灭菌后儿茶素含量无明显变化，脉冲式灭菌后几乎检测不到该成分，热压、干热灭菌后其含量明显降低；湿热灭菌后，样品结块变色现象严重。最终，选择钴-60 作为灭菌方式。

3 讨论

蜜膏剂、丸剂、散剂是维吾尔医临床常用剂型^[17]，有悠久的应用历史，其剂型特点常为药材直接粉碎入药的形式制备而成，普遍存在蜜膏剂药材粉碎加蜜而成。各种灭

表3 各成分加样回收率试验结果 (n=6)

成分	取样量/g	原有量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
没食子酸	0.057	0.983	0.848	1.831	100.02	101.46	1.71
	0.055	0.949	0.848	1.784	98.66		
	0.054	0.931	0.848	1.808	103.03		
	0.054	0.931	0.848	1.799	102.09		
	0.054	0.931	0.848	1.806	102.87		
	0.056	0.966	0.848	1.834	102.07		
儿茶素	0.057	2.290	1.616	3.923	100.76	100.96	1.46
	0.055	2.210	1.616	3.785	98.14		
	0.054	2.169	1.616	3.833	102.17		
	0.054	2.169	1.616	3.820	101.60		
	0.054	2.169	1.616	3.827	101.93		
	0.056	2.250	1.616	3.892	101.17		

表4 各成分含量测定结果 ($\bar{x} \pm s$)

灭菌方法	没食子酸		儿茶素	
	含量/(mg·g ⁻¹)	损失率/%	含量/(mg·g ⁻¹)	损失率/%
灭菌前	42.85±0.62	—	139.81±1.12	—
脉冲式灭菌	32.05±1.07	-25.2	0	-100.00
热压灭菌	46.31±1.69	8.07	39.24±1.13	-71.93
湿热灭菌	43.30±1.43	1.05	132.74±1.55	-5.06
干热灭菌	55.21±1.82	28.84	15.69±1.11	-88.78
钴-60 辐射灭菌	41.98±1.17	-2.03	135.22±1.60	-3.28

菌方法因“热”“湿”等问题，可能会造成药材性状的改变或有效成分的损失等影响，其中没食子酸、儿茶素均可溶于水，但对热不稳定，并且前者遇水易水解，故湿热、干热、脉冲式、热压灭菌处理后两者含量均有所变化；钴-

60 辐射灭菌不会引起温度或相对湿度上升，穿透力强，不易破坏有效成分，故可在不影响主要成分的前提下有效灭菌，可作为买朱制剂药材较好的灭菌方法。

除此之外，钴-60 辐照剂量的选择也非常重要，本实验

考察了能达到最大灭菌效果的最小剂量，而实际生产中应尽量减少重复辐照以保证药品质量。尽管辐射灭菌法具备许多优点，但中药成分复杂，直接进行辐照时其成分、疗效、安全性等方面均会存在隐患，故需对辐解产物毒性进行深入研究。同时，也应更广泛地探索各种药品、生药灭菌的最适宜照射剂量，使其更安全、实用、普遍，在灭菌过程中发挥出更大的作用^[18]。

参考文献：

- [1] 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.
- [2] 白洁, 迟玉明, 金红宇, 等.《中药辐照灭菌技术指导原则》解读[J]. 中成药, 2017, 39(7): 1537-1538.
- [3] 余元涛, 金文闻, 余龙江, 等. 基于灭菌效果和活性成分保持的玛咖灭菌方法研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2016, 7(4): 1652-1657.
- [4] 张春梅, 王振彬. HPLC 测定不同灭菌方法后丹参药材中丹参酮ⅡA 的含量变化[J]. 河北中医药学报, 2005, 20(2): 33-34.
- [5] 温金莲, 郭丽冰, 周清, 等. 保济丸中葛根素的含量测定及灭菌方法评价[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(23): 1-4.
- [6] 谭伯森, 李惠琴, 黄凤婷. 不同灭菌法对续断川续断皂苷Ⅵ含量的影响[J]. 现代医院, 2012, 12(4): 72-73.
- [7] 张蓓, 余陈欢, 王薇, 等. 复方土鳖虫冻干粉的最佳灭菌方法研究[J]. 中华中医药学刊, 2009, 27(9): 1964-1965.
- [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.
- [9] 王影, 张德柱. 高压蒸汽灭菌法对三七细粉中3种成分含量的影响[J]. 中国药业, 2014, 23(7): 4-5.
- [10] 王东, 蔡佳良, 郭丽冰, 等. 不同灭菌方法对保济丸中百秋李醇含量的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(12): 91-93.
- [11] 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.
- [12] 李跃辉, 王银, 张水寒, 等. 灭菌方法对牡丹皮粉体主要成分含量的影响[J]. 中国医药科学, 2012, 2(13): 41-42; 72.
- [13] 邹盛勤, 姜琼. RP-HPLC 测定茶叶中没食子酸、儿茶素和表儿茶素的含量[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(7): 322-324.
- [14] 侯颖. HPLC 法测定蠲痹抗生丸中儿茶素、表儿茶素、松果菊苷和毛蕊花糖苷[J]. 中成药, 2013, 35(12): 2649-2653.
- [15] 李建梅, 祖里皮亚·塔来提, 库尔班尼沙·买买提, 等. RP-HPLC 法测定开西尼孜散剂中没食子酸和鞣花酸的含量[J]. 西北药学杂志, 2015, 30(1): 26-28.
- [16] 徐奇超, 崔慧芳. HPLC 法测定痔速宁片中芦丁与没食子酸的含量[J]. 西北药学杂志, 2016, 31(1): 29-31.
- [17] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草(维吾尔药卷)[M]. 上海: 上海科技出版社, 2005: 229-231.
- [18] 李计萍. γ 射线辐照灭菌法在中药及其制剂中应用现状和相关问题讨论[J]. 中国中药杂志, 2007, 32(19): 2078-2081.