

开心散 ^{60}Co - γ 射线辐照灭菌工艺优化及不同灭菌方式对其质量影响研究

尚炳娴, 李 军, 张 佟, 高 丰, 徐 冰*, 雷海民*

北京中医药大学, 北京 102488

摘 要:目的 优选开心散最佳 ^{60}Co - γ 射线辐照灭菌工艺, 并对比不同灭菌方式对开心散的灭菌效果及质量的影响。方法 以西伯利亚远志糖 A5、西伯利亚远志糖 A6、远志呋酮 III、3,6'-二芥子酰基蔗糖、人参皂苷 Rb₁、 β -细辛醚、 α -细辛醚、去氢茯苓酸的含量和灭菌率的综合评分为指标, 采用层次分析 (analytic hierarchy process, AHP) 法确定各指标权重系数, 考察开心散不同辐照剂量的灭菌效果, 优化开心散辐照灭菌工艺参数; 通过微生物限度检测、指标成分含量及特征图谱检测, 并结合灭菌后的制剂性状, 对比辐照灭菌、湿热灭菌、干热灭菌和乙醇灭菌的灭菌效果和对开心散质量的影响。结果 按照确定的权重系数进行综合评价, 确定开心散最佳 ^{60}Co - γ 射线辐照灭菌工艺条件为辐照剂量 6 kGy; 不同方式灭菌样品的微生物限度检查均符合药典规定; 与未灭菌制剂相比, 经辐照灭菌后样品中西伯利亚远志糖 A6、3,6'-二芥子酰基蔗糖含量降低, 人参皂苷 Rb₁、 β -细辛醚和 α -细辛醚含量增加; 与辐照灭菌相比, 经干热灭菌后多种指标成分含量降低, 经乙醇灭菌后多种指标成分含量增加; 特征图谱结果显示, 各种灭菌方式样品与未灭菌样品相比相似度皆 > 0.99。结论 ^{60}Co - γ 射线辐照剂量在 6 kGy 及以上时能完全杀灭制剂中的微生物, 工艺稳定可行、重复性好, 且辐照灭菌法与其他灭菌方法相比, 在保证灭菌效果的同时能更大程度地保留开心散制剂中的主要成分, 得到符合规定的开心散制剂。

关键词: 开心散; ^{60}Co - γ 射线; 辐照灭菌; 西伯利亚远志糖 A5; 西伯利亚远志糖 A6; 远志呋酮 III; 3,6'-二芥子酰基蔗糖; 人参皂苷 Rb₁; β -细辛醚; α -细辛醚; 去氢茯苓酸; 层次分析法; 湿热灭菌; 干热灭菌; 乙醇灭菌

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2023)08-2408-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.08.007

Optimization of ^{60}Co - γ irradiation sterilization technology for Kaixin Powder and quality impact research for different sterilization methods

SHANG Bing-xian, LI Jun, ZHANG Tong, GAO Feng, XU Bing, LEI Hai-min

Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China

Abstract: Objective To optimize the sterilization process of Kaixin Powder, and compare the effect of different sterilization methods on the sterilization effect and quality of Kaixin Powder. **Method** With the content of sibiricose A5, sibiricose A6, polygalaxanthone III, 3,6'-disinapoyl sucrose, ginsenoside Rg₁, β -asarone, α -asarone, dehydropachymic acid and the sterilization rate as comprehensive evaluation indexes, weight coefficient of indicators were determined by analytic hierarchy process (AHP) to investigate the sterilization effect of Kaixin Powder with different irradiation doses, and optimize the irradiation sterilization process parameters of Kaixin Powder; The sterilization effect and quality of Kaixin Powder before and after sterilization were compared by irradiation sterilization, moist heat sterilization, dry heat sterilization and ethanol sterilization through microbial limit detection, index component content and characteristic map detection. **Results** According to the comprehensive evaluation of determined weight coefficient, the optimal ^{60}Co - γ -ray irradiation sterilization process conditions for Kaixin Powder were determined to be 6 kGy. The microbial limit inspection of each sterilized sample complies with the pharmacopoeia regulations. Compared with the unsterilized preparation, after irradiation sterilization, the contents of sibiricose A6 and 3,6'-disinapoyl sucrose were decreased, while the contents of ginsenoside Rb₁, β -asarone and α -asarone were increased. Compared with radiation sterilization, the content of multiple index

收稿日期: 2022-09-11

基金项目: 科技部重大专项“科技助力经济 2020 重点专项清肺排毒 5 号中药复方制剂研发及产业化”(2020YFF0426288)

作者简介: 尚炳娴 (1998—), 女, 硕士研究生在读, 研究方向为经典名方的新药研发。Tel: 15606166945 E-mail: shangbingxian@163.com

*通信作者: 雷海民 (1968—), 男, 博士, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为中药先导化合物发现与开发。

Tel: (010) 84738641 E-mail: hm_lei@126.com

徐 冰 (1993—) 男, 博士, 讲师, 研究方向为中药新药研发。Tel: 18101256991 E-mail: weichenxubing@126.com

components was decreased after dry heat sterilization, but increased after ethanol sterilization. The specific chromatogram results showed that the similarity of the samples with different sterilization methods was more than 0.99 compared with the unsterilized samples. **Conclusion** Irradiation dose greater than or equal to 6 kGy can completely kill the microorganisms in the preparation, and the process is stable and feasible with good repeatability. Compared with other sterilization methods, the irradiation sterilization method can not only ensure the sterilization effect, but also retain the main components of Kaixin Powder preparation to a greater extent, and get the prescribed Kaixin Powder preparation.

Key words: Kaixin Powder; ^{60}Co - γ radial; irradiation sterilization; sibiricose A5; sibiricose A6; polygalaxanthone III; 3,6'-disinapoyl sucrose; ginsenoside Rb₁; β -asarone; α -asarone; dehydropachymic acid; analytic hierarchy process; moist heat sterilization; dry heat sterilization; ethanol sterilization

开心散出自唐代孙思邈的《备急千金要方》，由人参、远志、茯苓和石菖蒲 4 味药组成，具有益气养心、安神定志的功效，主治心气不足、神志不宁、健忘失眠及心怯怔忡等证，临床上多用于治疗阿尔茨海默症及各种抑郁症，疗效显著、应用广泛^[1]。

中药材的活性成分是保证药品安全有效的指标，因此，在对中药制剂进行灭菌后，不仅要考虑灭菌率，更应该在保证灭菌效果的同时尽可能地保留有效成分不被破坏^[2]。中药材及制剂常用灭菌方法有湿热灭菌、干热灭菌、过滤灭菌、 ^{60}Co - γ 射线辐照灭菌等，处方中含热敏性、芳香性成分并以药材原粉入药，且质量标准对该药味有含量要求的可采用辐照杀菌^[4]。辐照灭菌方法无需升温升压，不易破坏药粉中的挥发性成分及热敏物质，且具有灭菌均匀、速度快、时间短、操作简单等优点^[3]，我国 ^{60}Co - γ 辐照加工技术已经有 50 多年的研究和应用历史，工艺技术成熟，基本实现了商业化应用^[4]。目前对于开心散灭菌工艺的研究不多，故本研究以开心散制剂为研究对象，以西伯利亚远志糖 A5、西伯利亚远志糖 A6、远志吡酮 III、3,6'-二芥子酰基蔗糖、人参皂苷 Rb₁、 β -细辛醚、 α -细辛醚、去氢茯苓酸的含量以及灭菌率作为评价指标，采用多指标权重分析法优选开心散辐照灭菌工艺，同时与常规灭菌方法进行对比研究，对辐照灭菌技术的优势进行探讨，为后续制剂开发提供依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Waters e2695 型高效液相色谱仪，美国 Waters 公司；Waters Sunfire C₁₈ 色谱柱（250 mm×4.6 mm，5 μm ）；KQ5200DA 型超声波清洗器，昆山市超声仪器有限公司；FW100 型高速粉碎机，天津市泰斯特仪器有限公司；药典筛，中国航空工业第四五零厂；LRH-250 型生化培养箱、MJ-250F-1 型霉菌培养箱，上海一恒科学仪器有限公司；VS-1300L-U

型洁净工作台，苏州安泰空气技术有限公司。

1.2 试剂

对照品人参皂苷 Rb₁（批号 110704-202129，质量分数 94.3%）、3,6'-二芥子酰基蔗糖（批号 111848-202006，质量分数 96.5%）、 β -细辛醚（批号 112018-201802，质量分数 99.3%）、远志吡酮 III（批号 11850-201203，质量分数 96.5%）均购于中国食品药品检定研究院；对照品西伯利亚远志糖 A5（批号 P2207F23346，质量分数≥98.0%）、西伯利亚远志糖 A6（批号 P18N7F25166，质量分数≥95.0%）、 α -细辛醚（批号 R27J7Y1678，质量分数≥98.0%）均购于上海源叶生物科技有限公司；对照品去氢茯苓酸（批号 PS011211，质量分数≥98.0%）购于成都普思生物科技股份有限公司；pH 7.0 氯化钠-蛋白胨缓冲液（批号 20200813）、沙氏葡萄糖琼脂（批号 20211221）、胰酪大豆胨琼脂（批号 20211216）均购于青岛高科技工业园海博生物技术有限公司。

色谱纯乙腈，Fisher 公司；分析纯甲醇、磷酸，国药集团化学试剂有限公司；试验用水为实验室自制超纯水。

1.3 药材

开心散所用药材购自安国聚药堂有限公司，经河北省药品医疗器械检验研究院鉴定，符合《中国药典》2020 年版规定品种。药材按照《中国药典》2020 年版^[5]规定检测均符合规定，由北京春风药业有限公司按照前期研究确定的各药材炮制方法^[6]进行炮制加工成各批次饮片，并按照符合《中国药典》2020 年版规定的要求检测，均符合规定。

实验所用的人参药材为五加科人参属植物人参 *Panax ginseng* C. A. Mey. 的干燥根和根茎，产地吉林延边，批号为 RSYC-12；远志药材为远志科远志属植物远志 *Polygala tenuifolia* Willd. 的干燥根，产地陕西合阳，批号为 YZYC-13；茯苓药材为多孔菌科茯苓属真菌茯苓 *Poria cocos* (Schw.) Wolf 的干燥

菌核,产地湖南靖州,批号为 FLYC-07;石菖蒲药材为天南星科菖蒲属植物石菖蒲 *Acorus tatarinowii* Schott 的干燥根茎,产地江西吉安,批号为 SCPYC-09。制备开心散物质基准所用饮片产地批号分别为人参 RSYP-12(吉林延边)、远志 YZYP-13(陕西合阳)、茯苓 FLYP-07(湖南靖州)、石菖蒲 SCPYP-09(江西吉安)。

2 方法与结果

2.1 不同灭菌样品的制备

2.1.1 开心散未灭菌样品(K0)的制备 取适量人参、远志、茯苓和石菖蒲饮片分别粉碎,过 100 目筛,将所得 4 味药材细粉按 1:1:2:1 混匀,即得。

2.1.2 辐照灭菌 取开心散未灭菌样品,用双层 PE 袋包装,内包装袋选用自封口 PE 袋,外包装 PE 袋用真空热塑封口,每袋 50 g,送于广州华大生物科技公司,采用 ^{60}Co - γ 射线进行辐照灭菌。剂量率为 0.33 kGy/h,分别辐照 2、4、6、8、10 kGy(药典规定辐照剂量不超过 10 kGy),样品分别编号 K1~K5。

2.1.3 干热灭菌 取 100 g 开心散未灭菌样品均匀平铺于托盘中,再用牛皮纸包裹放置在干热灭菌柜中,按 160 $^{\circ}\text{C}$ 、30 min 条件进行灭菌。之后,放入真空干燥箱中,设置温度 70 $^{\circ}\text{C}$,抽真空,干燥时间 30 min^[7]。

2.1.4 湿热灭菌 取 100 g 开心散未灭菌样品均匀平铺于托盘中,再用牛皮纸包裹放置在立式蒸汽灭菌柜中,按 121 $^{\circ}\text{C}$ 、15 min 程序进行灭菌。之后,放入真空干燥箱中,设置温度 70 $^{\circ}\text{C}$,抽真空,干燥时间 2 h^[8]。

2.1.5 乙醇灭菌 取 50 g 开心散未灭菌样品,量取粉体质量 34%的 80%乙醇溶液,采用等量递增法在容器中混合均匀后,置于 100 mL 离心管中,在真空干燥箱中,温度为 70 $^{\circ}\text{C}$ 、真空度为 0.09 MPa,干燥 1 h^[3]。

2.2 指标成分含量测定方法的建立

2.2.1 色谱条件 流动相为乙腈-0.05%磷酸水溶液,梯度洗脱:0~10 min, 10%~15%乙腈;10~13 min, 15%乙腈;13~18 min, 15%~16%乙腈;18~25 min, 16%~17%乙腈;25~30 min, 17%~22%乙腈;30~36 min, 22%~24%乙腈;36~46 min, 24%~28%乙腈;46~53 min, 28%~33%乙腈;53~58 min, 33%~40%乙腈;58~82 min, 40%乙腈;82~85 min, 40%~77%乙腈;85~95 min,

77%~80%乙腈;95~105 min, 80%~95%乙腈;105~115 min, 95%乙腈;检测波长 203、245 nm;柱温 30 $^{\circ}\text{C}$;体积流量 1.0 mL/min;进样量 20 μL 。

2.2.2 对照品溶液的制备 分别精密称取西伯利亚远志糖 A5 对照品 7.3 mg、西伯利亚远志糖 A6 对照品 6.0 mg、远志呋酮 III 对照品 1.8 mg、3,6'-二芥子酰基蔗糖对照品 14.5 mg、人参皂苷 Rb_1 对照品 8.1 mg、 β -细辛醚对照品 35.7 mg、 α -细辛醚对照品 2.3 mg、去氢茯苓酸对照品 0.73 mg,置于同一量瓶中,加 75%甲醇定容至 50 mL,制成混合对照品母液。

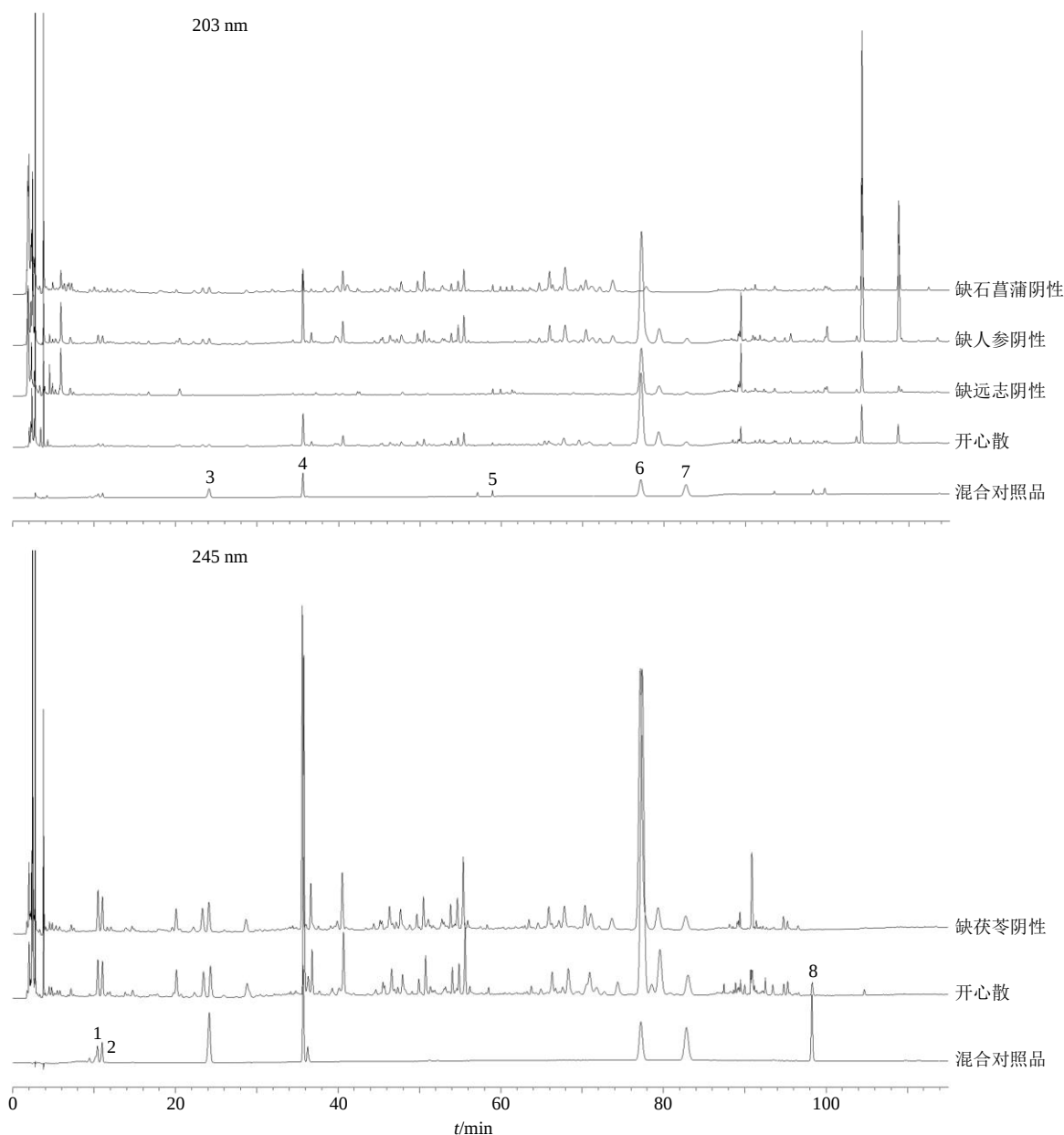
精密移取 2 mL 混合对照品母液,加 75%甲醇定容至 10 mL,作为混合对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液的制备 分别精密称取不同灭菌方式及未灭菌开心散样品粉末各 1.0 g,精密加入 75%甲醇 25 mL,超声处理 30 min,用 0.45 μm 微孔滤膜滤过,即得。

2.2.4 专属性考察 按照“2.1.1”项确定的样品制备方法分别制备不含人参、远志、茯苓、石菖蒲的阴性样品,并按照“2.2.3”项确定的供试品溶液制备方法分别制备缺人参、缺远志、缺茯苓和缺石菖蒲的阴性对照溶液;取开心散供试品及 4 味药阴性供试品溶液,按照“2.2.1”项确定的色谱条件进行 HPLC 分析,记录色谱图,结果见图 1。

2.2.5 线性关系考察 精密量取对照品混合母液,分别稀释至 1、2、5、10、20、100 倍,按“2.2.1”项下色谱条件进行 HPLC 分析,考察各指标成分峰面积与质量浓度之间的线性关系,结果分别为西伯利亚远志糖 A5 $Y=18\,698\,077 X-6036$, $r=0.999\,9$, 线性范围 1.4~140.0 $\mu\text{g/mL}$;西伯利亚远志糖 A6 $Y=24\,399\,204 X-16\,199$, $r=0.999\,9$, 线性范围 1.2~120.0 $\mu\text{g/mL}$;远志呋酮 III $Y=46\,184\,838 X-6799$, $r=0.999\,8$, 线性范围 0.35~35.00 $\mu\text{g/mL}$;3,6'-二芥子酰基蔗糖 $Y=38\,996\,583 X-10\,405$, $r=0.999\,9$, 线性范围 2.8~280.0 $\mu\text{g/mL}$;人参皂苷 Rb_1 $Y=4\,324\,236 X-3304$, $r=0.999\,9$, 线性范围 1.5~150.0 $\mu\text{g/mL}$; β -细辛醚 $Y=106\,913\,222 X-824\,180$, $r=0.999\,3$, 线性范围 7.1~710.0 $\mu\text{g/mL}$; α -细辛醚 $Y=105\,387\,231 X-7836$, $r=0.999\,9$, 线性范围 0.44~44.00 $\mu\text{g/mL}$;去氢茯苓酸 $Y=35\,355\,093 X-142$, $r=0.999\,6$, 线性范围 0.15~15.00 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.2.6 精密度试验 取未灭菌样品供试品溶液进行 HPLC 分析,按照“2.2.1”项下色谱条件连续重复 6 次,分别测定各指标成分的峰面积,计算其 RSD,



1-西伯利亚远志糖 A5 2-西伯利亚远志糖 A6 3-远志呋酮III 4-3,6'-二芥子酰基蔗糖 5-人参皂苷 Rb₁ 6-β-细辛醚 7-α-细辛醚 8-去氢茯苓酸
1-sibiricose A5 2-sibiricose A6 3-polygalaxanthone III 4-3,6'-disinapoyl sucrose 5-ginsenoside Rb₁ 6-β-asarone 7-α-asarone 8-dehydropachymic acid

图 1 混合对照品溶液、开心散供试品溶液及阴性对照品溶液的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC profiles of mixed reference substances, Kaixin Powder test solution and negative control solutions

结果西伯利亚远志糖 A5、西伯利亚远志糖 A6、远志呋酮III、3,6'-二芥子酰基蔗糖、人参皂苷 Rb₁、β-细辛醚、α-细辛醚、去氢茯苓酸峰面积的 RSD 分别为 0.81%、0.86%、0.77%、0.28%、1.73%、0.47%、0.78%、0.89%。

2.2.7 稳定性试验 取与精密度试验同一供试品溶液进行 HPLC 分析，按“2.2.1”项下色谱条件，分别制备后于 0、2、4、8、12、24 h 进样，测定各指标成分的峰面积，计算其 RSD，结果西伯利亚远志

糖 A5、西伯利亚远志糖 A6、远志呋酮III、3,6'-二芥子酰基蔗糖、人参皂苷 Rb₁、β-细辛醚、α-细辛醚、去氢茯苓酸峰面积的 RSD 分别为 1.80%、1.51%、1.96%、0.22%、1.15%、0.46%、1.21%、0.89%。

2.2.8 重复性试验 分别精密称取与精密度试验同一批次基准样品粉末 0.5、1.0、1.5 g 各 3 份，按“2.2.3”项下确定的方法制备供试品溶液，并按照“2.2.1”项下色谱条件进行 HPLC 分析，测各指标成分的峰面积，计算各指标成分的质量分数及其 RSD，结果

西伯利亚远志糖 A5、西伯利亚远志糖 A6、远志吡酮Ⅲ、3,6'-二芥子酰基蔗糖、人参皂苷 Rb₁、β-细辛醚、α-细辛醚、去氢茯苓酸质量分数的 RSD 分别为 2.47%、1.86%、2.15%、2.27%、2.78%、1.71%、1.99%、1.12%。

2.2.9 加样回收率试验 精密称取 0.5 g 与重复性试验同一批次基准样品粉末 9 份, 分别按照已知各指标成分含量的 1:0.5、1:1、1:1.5 比例精密量取对照品混合母液适量, 按“2.2.2”项下方法稀释至适宜质量浓度制备混合对照品溶液; 以混合对照品溶液为提取溶剂, 按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液, 每个质量浓度平行 3 份; 并按照“2.2.1”项下色谱条件依次进行 HPLC 分析, 测定各指标成分的含量, 计算其加样回收率, 结果西伯利亚远志糖 A5、西伯利亚远志糖 A6、远志吡酮Ⅲ、3,6'-二芥子酰基蔗糖、人参皂苷 Rb₁、β-细辛醚、α-细辛醚、去氢茯苓酸的加样回收率分别为 102.23%、100.09%、101.19%、99.16%、98.77%、101.12%、100.68%、99.50%, RSD 分别为 2.88%、2.30%、2.35%、2.80%、2.36%、2.96%、1.23%、2.24%。

2.2.10 样品测定 分别取辐照灭菌、干热灭菌、湿热灭菌、乙醇灭菌及未灭菌的样品, 按照“2.2.3”项确定的供试品溶液制备方法分别制备相应的供试品溶液, 并按照“2.2.1”项确定的色谱条件进行 HPLC 分析, 测定各指标成分的含量。

2.3 灭菌率测定

根据《中国药典》2020 年版四部通则 1105 项下的非无菌产品微生物限度检测法中的平板计数法对制备的样品菌总数进行测定, 计算灭菌率^[3]。

样品菌总数=样品细菌总数+霉菌及酵母菌总数

灭菌率=(未处理样品菌总数-处理样品菌总数)/未处理样品菌总数

2.4 指标权重系数的确定

运用层次分析法对各指标进行排序^[9], 根据处方中药味的君臣佐使配伍规律、药味含量占比及各指标成分药理作用强弱, 将 8 个指标分成 4 个层次, 确定其先后次序为灭菌率>β-细辛醚=3,6'-二芥子酰基蔗糖>西伯利亚远志糖 A6=人参皂苷 Rb₁=西伯利亚远志糖 A5>α-细辛醚=远志吡酮Ⅲ=去氢茯苓酸; 构建指标成对比较判断矩阵, 结果见表 1。

根据表 1 中的评分进行权重的计算^[10-11], 得到灭菌率、β-细辛醚、3,6'-二芥子酰基蔗糖、西伯利亚远志糖 A6、人参皂苷 Rb₁、西伯利亚远志糖 A5、α-细辛醚、远志吡酮Ⅲ、去氢茯苓酸含量的权重系数分别为 0.314 6、0.145 9、0.145 9、0.084 1、0.084 1、0.084 1、0.047 2、0.047 2、0.047 2。对所得权重系数进行一致性检验, 得到随机一致性比率 CR=0.006 4<0.1, 满足一致性要求, 可认为所得权重系数合理有效。

根据所得权重系数, 对 6 种不同辐照灭菌工艺所得开心散样品进行综合评分, 计算公式如下。

综合评分=灭菌率/灭菌率最大值×0.314 6+β-细辛醚含量/β-细辛醚含量最大值×0.145 9+3,6'-二芥子酰基蔗糖含量/3,6'-二芥子酰基蔗糖含量最大值×0.145 9+西伯利亚远志糖 A6 含量/西伯利亚远志糖 A6 含量最大值×0.084 1+人参皂苷 Rb₁ 含量/人参皂苷 Rb₁ 含量最大值×0.084 1+西伯利亚远志糖 A5 含量/西伯利亚远志糖 A5 含量最大值×0.084 1+α-细辛醚含量/α-细辛醚含量最大值×0.047 2+远志吡酮Ⅲ含量/远志吡酮Ⅲ含量最大值×0.047 2+去氢茯苓酸含量/去氢茯苓酸含量最大值×0.047 2

表 1 指标成对比较的优先矩阵

Table 1 Priority matrix for pairwise comparison of indicators

权重指标	灭菌率	β-细辛醚	3,6'-二芥子 酰基蔗糖	西伯利亚 远志糖 A6	人参皂苷 Rb ₁	西伯利亚 远志糖 A5	α-细辛醚	远志吡酮 Ⅲ	去氢茯苓酸
灭菌率	1.00	3.00	3.00	4.00	4.00	4.00	5.00	5.00	5.00
β-细辛醚	0.33	1.00	1.00	2.00	2.00	2.00	3.00	3.00	3.00
3,6'-二芥子酰基蔗糖	0.33	1.00	1.00	2.00	2.00	2.00	3.00	3.00	3.00
西伯利亚远志糖 A6	0.25	0.50	0.50	1.00	1.00	1.00	2.00	2.00	2.00
人参皂苷 Rb ₁	0.25	0.50	0.50	1.00	1.00	1.00	2.00	2.00	2.00
西伯利亚远志糖 A5	0.25	0.50	0.50	1.00	1.00	1.00	2.00	2.00	2.00
α-细辛醚	0.20	0.33	0.33	0.50	0.50	0.50	1.00	1.00	1.00
远志吡酮Ⅲ	0.20	0.33	0.33	0.50	0.50	0.50	1.00	1.00	1.00
去氢茯苓酸	0.20	0.33	0.33	0.50	0.50	0.50	1.00	1.00	1.00

2.5 辐照灭菌工艺的确定及验证

2.5.1 不同灭菌工艺结果分析 分别对辐照 2、4、6、8、10 kGy 的开心散灭菌样品 (K1~K5) 及未灭菌样品 (K0) 进行含量测定和微生物限度检查, 并计算灭菌率及综合评分, 结果见表 2。由结果分析可知, 不同剂量辐照灭菌的灭菌率均大于 96%, 且 $^{60}\text{Co}-\gamma$ 剂量在 6 kGy 及以上时可杀灭样品中所有霉菌及需氧菌。最终优选的 $^{60}\text{Co}-\gamma$ 辐照灭菌工艺为灭菌剂量 6 kGy。

2.5.2 工艺验证 精密称取开心散未灭菌样品 3 份, 按最佳工艺条件进行灭菌, 测定 3 批灭菌样品

(1~3) 及未灭菌样品 (0) 各指标成分含量, 测定并计算灭菌率, 进行综合评分, 并计算 3 批工艺验证样品各项指标的 RSD, 结果见表 3。3 批验证试验结果中, β -细辛醚、3,6'-二芥子酰基蔗糖、西伯利亚远志糖 A6、人参皂苷 Rb₁、西伯利亚远志糖 A5、 α -细辛醚、远志呋酮 III、去氢茯苓酸的平均质量分数分别为 3.420 1、1.357 8、0.409 6、1.148 7、0.286 5、0.163 0、0.196 3、0.070 8 mg/g, 平均灭菌率为 100%, 平均综合评分为 98.72 (RSD 为 0.63%), 表明该工艺稳定、可行、重复性好, 可作为开心散灭菌工艺。

表 2 不同辐照剂量样品检查结果 ($n=2$)

Table 2 Test results of samples with different irradiation doses ($n=2$)

样品 编号	质量分数/(mg·g ⁻¹)								灭菌率/ %	综合评分
	β -细辛醚	3,6'-二芥子 酰基蔗糖	西伯利亚 远志糖 A6	人参皂苷 Rb ₁	西伯利亚 远志糖 A5	α -细辛醚	远志呋酮 III	去氢茯苓酸		
K0	2.874 5	1.371 8	0.291 4	0.867 8	0.408 3	0.140 1	0.208 0	0.071 8	0	62.92
K1	3.578 3	1.312 5	0.284 1	0.939 8	0.393 1	0.166 7	0.192 9	0.069 2	96.86	95.89
K2	3.480 6	1.256 0	0.278 9	1.012 4	0.404 1	0.183 6	0.220 7	0.070 8	96.57	96.61
K3	3.496 2	1.206 5	0.277 4	1.019 7	0.413 8	0.183 7	0.204 4	0.069 2	100	96.98
K4	3.523 8	1.237 6	0.263 7	0.984 7	0.409 4	0.184 9	0.198 2	0.068 8	100	96.53
K5	3.573 0	1.147 0	0.227 7	0.946 2	0.376 4	0.182 5	0.191 0	0.070 6	100	93.64

表 3 工艺验证实验结果 ($n=2$)

Table 3 Test results of process verification ($n=2$)

样品 批号	质量分数/(mg·g ⁻¹)								灭菌率/ %	综合评分
	β -细辛醚	3,6'-二芥子 酰基蔗糖	西伯利亚 远志糖 A6	人参皂苷 Rb ₁	西伯利亚 远志糖 A5	α -细辛醚	远志呋酮 III	去氢茯苓酸		
0	3.077 6	1.354 7	0.291 0	1.130 7	0.418 2	0.154 8	0.203 8	0.070 8	0	65.90
1	3.448 8	1.368 1	0.295 7	1.120 5	0.417 0	0.161 8	0.201 2	0.070 4	100	99.21
2	3.368 1	1.344 6	0.283 5	1.143 7	0.409 7	0.159 6	0.194 4	0.069 6	100	98.02
3	3.443 3	1.360 8	0.280 4	1.182 1	0.402 2	0.167 5	0.193 2	0.072 5	100	98.93
RSD/%	1.32	0.89	2.81	2.71	1.81	2.50	2.22	2.07	0	0.63

2.6 辐照灭菌与其他灭菌方式的比较

2.6.1 微生物限度 按《中国药典》2020 年版四部通则 1 105 项下的非无菌产品微生物限度检测法中的平板计数法, 测定不同灭菌方式开心散样品及未灭菌开心散样品的菌总数, 结果见表 4。各灭菌样品均合格。

2.6.2 指标成分含量 按“2.2.3”项下方法制备不同灭菌方式开心散样品及未灭菌样品的供试品溶液, 并按“2.2.1”项下色谱条件测定不同灭菌方式开心散样品及未灭菌样品中各指标成分的含量, 并

计算不同灭菌方式指标成分含量变化率, 计算公式为变化率 = $(C - C_0)/C_0$ (C_0 为表 7 条件对比中前者含量, C 为后者含量)。结果见表 5、6。

2.6.3 指纹图谱相似度评价 按“2.2.3”项下方法制备不同灭菌方式开心散样品及未灭菌样品的供试品溶液, 按“2.2.1”项色谱条件测定不同灭菌方式开心散样品及未灭菌样品的指纹图谱, 以未灭菌样品指纹图谱为参照图谱, 计算不同灭菌方式样品指纹图谱的相似度, 结果见表 5 和图 2。

2.6.4 制剂性状 开心散未灭菌制剂性状为淡黄色

表 4 不同灭菌方式及未灭菌样品微生物限度检查结果 ($n=3$)Table 4 Test results of microbial limits of different sterilized methods and unsterilized samples ($n=3$)

灭菌方式	菌总数/(cfu·g ⁻¹)		灭菌率/%
	需氧菌	霉菌	
未灭菌	2500	1000	0
辐照灭菌	未检出	未检出	100
湿热灭菌	未检出	未检出	100
干热灭菌	未检出	未检出	100
乙醇灭菌	230	170	88.57

表 5 不同灭菌方式及未灭菌样品含量测定及指纹图谱相似度检查结果

Table 5 Test results of content determination and fingerprints similarity of different sterilized methods unsterilized samples

灭菌方式	质量分数/(mg·g ⁻¹)								相似度	
	β -细辛醚	3,6'-二芥子酰基蔗糖	西伯利亚远志糖 A6	人参皂苷 Rb ₁	西伯利亚远志糖 A5	α -细辛醚	远志呋酮 III	去氢茯苓酸	203 nm	245 nm
未灭菌	2.874 5	1.371 8	0.291 4	0.867 8	0.408 3	0.140 1	0.208 0	0.071 8	1.000	1.000
辐照灭菌	3.496 2	1.206 5	0.277 4	1.019 7	0.413 8	0.183 7	0.204 4	0.069 2	0.991	0.998
湿热灭菌	2.910 5	0.871 5	0.263 4	0.534 8	0.363 0	0.347 0	0.070 2	0.073 9	0.989	0.995
干热灭菌	2.913 5	1.154 7	0.308 6	1.044 5	0.423 8	0.194 9	0.140 8	0.067 0	0.989	0.999
乙醇灭菌	3.603 6	1.444 9	0.300 6	1.159 3	0.418 7	0.234 8	0.209 7	0.072 3	0.984	0.998

表 6 不同灭菌方式样品指标成分含量变化率

Table 6 Change rate of index component content of samples with different sterilization methods

条件对比	变化率/%							
	β -细辛醚	3,6'-二芥子酰基蔗糖	西伯利亚远志糖 A6	人参皂苷 Rb ₁	西伯利亚远志糖 A5	α -细辛醚	远志呋酮 III	去氢茯苓酸
辐照灭菌与未灭菌	21.63	-12.05	-4.81	17.51	1.34	31.17	-1.73	-3.67
湿热灭菌与辐照灭菌	-16.75	-27.76	-5.04	-47.55	-12.27	88.86	-65.68	6.86
干热灭菌与辐照灭菌	-16.67	-4.30	11.28	2.43	2.42	6.11	-31.10	-3.17
乙醇灭菌与辐照灭菌	3.07	19.76	8.37	13.69	1.20	27.80	2.57	4.50

些细菌、霉菌或其他致病菌^[13], 为保证含药材原粉中药制剂的安全性, 需要选择合适的灭菌方法进行灭菌, 使其达到微生物限度要求, 同时还要兼顾开心散中主要药效成分的变化情况, 以保证制剂的有效性^[14]。

《备急千金要方》^[15]记载开心散的功效主治为“主好忘”, 方中人参、远志均具有安神益智的作用, 其中人参为君药、远志为臣药, 现代研究表明开心散发挥作用的物质基础主要为人参皂苷、远志皂苷、远志酮等^[16]; 茯苓为方中佐药, 具有宁心安神、利水渗湿的功效; 石菖蒲为方中使药, 具有祛痰开窍、化湿开胃的功效, 可促进其他成分的体内吸收, 研

粉末, 经干热灭菌后粉末呈棕黄色至黄褐色, 颜色明显加深; 经湿热灭菌后粉末呈棕黄色至黄褐色, 颜色明显加深, 并有结块出现; 经辐照灭菌和乙醇灭菌后粉末呈淡黄色, 与未灭菌样品无明显差异。

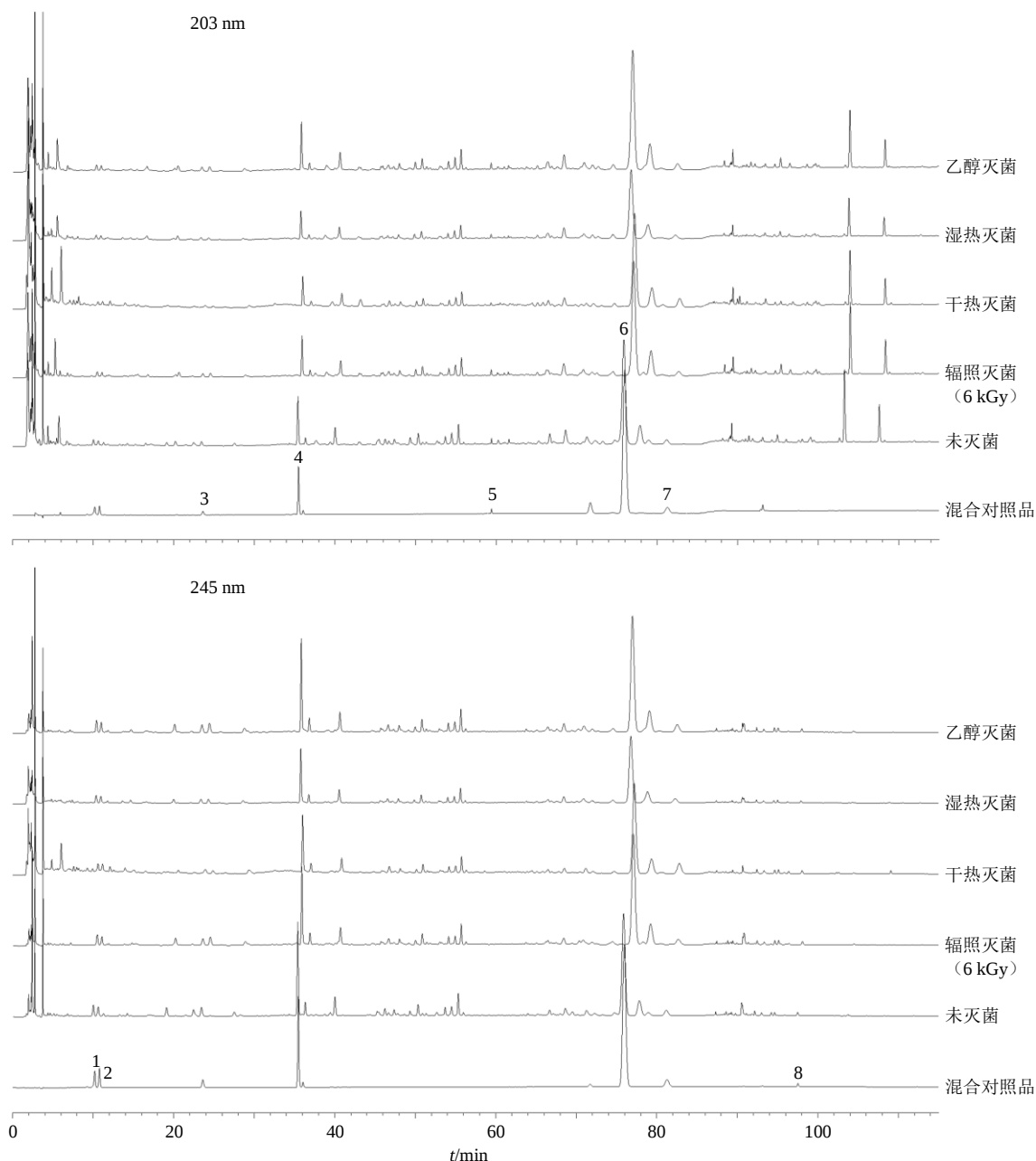
3 讨论

按照《古代经典名方中药复方制剂及其物质基

准的申报资料要求(征求意见稿)》^[12]要求, 来源于经典名方的中药复方制剂剂型应当与古籍记载一致, 《备急千金要方》记载开心散剂型为散剂, 是原粉直接冲服。中药材饮片经过筛选、洗净、炮制等处理后, 大多数的中药饮片仍会不同程度地带有一

研究表明石菖蒲中的 β -细辛醚等挥发油类成分具有打开血脑屏障作用^[16-17]。因此, 分别选取人参中的人参皂苷 Rb₁, 远志中的西伯利亚远志糖 A5、西伯利亚远志糖 A6、远志呋酮 III、3,6'-二芥子酰基蔗糖, 茯苓中的去氢茯苓酸以及石菖蒲中的 α -细辛醚、 β -细辛醚作为开心散物质基准含量测定的指标成分。

本研究对采用辐照灭菌、干热灭菌、湿热灭菌和乙醇灭菌 4 种灭菌方法及未灭菌的开心散样品进行检测, 结果显示 4 种灭菌方法微生物限度检查均符合《中国药典》2020 年版散剂规定, 其中辐照灭菌、干热灭菌和湿热灭菌可完全杀灭制剂中的微生物, 但经干热灭菌和湿热灭菌后开心散制剂的颜色



1-西伯利亚远志糖 A5 2-西伯利亚远志糖 A6 3-远志吡喃III 4-3,6'-二芥子酰基蔗糖 5-人参皂苷 Rb₁ 6-β-细辛醚 7-α-细辛醚 8-去氢茯苓酸
1-sibiricose A5 2-sibiricose A6 3-polygalaxanthone III 4-3,6'-disinapoyl sucrose 5-ginsenoside Rb₁ 6-β-asarone 7-α-asarone 8-dehydropachymic acid

图 2 不同灭菌方式及未灭菌样品指纹图谱

Fig. 2 Fingerprints of different sterilized methods and unsterilized samples

加深或出现结块现象。

与未灭菌制剂相比,经乙醇灭菌后制剂中 8 种指标成分含量均增加,推测原因为乙醇促进开心散中成分的溶出^[18];经辐照灭菌和干热灭菌后制剂中人参皂苷 Rb₁ 含量增加,推测存在其他人参皂苷向人参皂苷 Rb₁ 的转化;经辐照灭菌后制剂中 α-细辛醚和 β-细辛醚含量增加,推测辐照处理更利于减少挥发性成分的损失;经湿热灭菌后制剂中除 α-细辛

醚外 7 种指标成分含量均减少,说明湿热灭菌对开心散制剂有影响。

与干热灭菌相比,辐照灭菌能更大程度地保留开心散中的主要药效成分,具有灭菌率高、操作简便等优势,且无污染、无药物残留、不会产生感生放射性^[19],是实际大生产中的一种常用灭菌方法,可用于开心散制剂的灭菌。

由于中药材成分比较复杂,单一指标不能体现

中药的整体质量,因此多指标综合评价已经成为现代研究中药的重要方法之一^[20],本研究采用层次分析法对不同辐照剂量的灭菌结果进行分析,确定最佳灭菌工艺为辐照剂量 6 kGy,随之开展 3 批工艺验证实验,微生物限度检查及含量测定结果表明该灭菌工艺稳定可靠,可为经典名方开心散的后续研究和工业生产提供科学、可靠的依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 尚炳娴,赵振霞,曾琪,等.经典名方开心散的基准样品关键质量属性研究[J].中国中药杂志,2023,48(2): 382-389.
- [2] 崔琳琳,冯巧巧,曹玲,等.覆盆子生药粉湿热灭菌工艺优化及不同灭菌方式对质量影响研究[J].药物评价研究,2022,45(5): 918-925.
- [3] 康超超.基于理化特性与生物评价的当归生药粉灭菌工艺研究[D].南昌:江西中医药大学,2020.
- [4] 林彤,毕福钧,吕渭升,等.中药的辐照灭菌现状与监管[J].中国药理学杂志,2019,54(17): 1442-1447.
- [5] 中国药典[S].一部.2020: 8-9, 93-94, 163-164, 251-252.
- [6] 尚炳娴,戴子琦,吴倩文,等.经典名方开心散的处方与本草考证[J].西北药学杂志,2022,37(3): 12-19.
- [7] 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.
- [8] 肖畅,张颖,刘元雪,等.水牛角生药粉灭菌工艺研究[J].天津药学,2021,33(1): 7-9.
- [9] 马冬妮,冯银平,何军刚,等.基于层次分析权重系数的均匀设计法优选肉苁蓉的黑豆汁炮制工艺[J].时珍国医国药,2020,31(9): 2143-2145.
- [10] 唐茜,韩云凤,石懿,等.混合加权法结合响应面试验优化视力舒颗粒煎煮工艺[J].中国现代应用药学,2022,39(4): 480-486.
- [11] 鄂秀辉,杨志城,孙彩虹.黄芪蜜炙工艺研究中两种主观赋权方法选择[J].海峡药学,2022,34(3): 49-53.
- [12] 国家药监局综合司.公开征求古代经典名方中药复方制剂及其物质基准申报资料要求(征求意见稿)意见[EB/OL]. [2021-03-04]. <https://www.nmpa.gov.cn/xxgk/zhqyj/zhqyiyp/20190327150101694.html>.
- [13] 陈颖,禹鹏鑫,丁辉,等.经典名方开心散不同温度高压蒸汽灭菌条件下 9 种指标成分含量变化研究[J].中草药,2021,52(4): 976-981.
- [14] 周天姣.生慧颗粒的制备工艺与益智延寿药效物质基础研究[D].武汉:湖北中医药大学,2021.
- [15] 孙思邈.备急千金要方[M].鲁兆麟,主校.沈阳:辽宁科学技术出版社,1997: 11, 222-223.
- [16] 户京京,张晓光,杨建会,等.开心散神经系统作用现代研究[J].辽宁中医药大学学报,2022,24(1): 61-66.
- [17] 于尚民.开心散抗抑郁作用机制及其活性成分人参皂苷 Rg₁ 脑靶向递送研究[D].长春:吉林大学,2022.
- [18] 郝豪奇.加压溶剂提取对丹参成分及活性的影响[D].青岛:青岛科技大学,2020.
- [19] 张奇志,王文亮,王守经,等.γ射线辐照技术对中药灭菌的应用研究进展[J].中国现代药物应用,2007,1(2): 62-63.
- [20] 张伟,孙叶芬,金传山,等.中药配方颗粒研究现状与展望[J].中草药,2022,53(22): 7221-7233.

[责任编辑 郑礼胜]