

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2021.17.014

不同灭菌方法对桑叶超微粉中芦丁含量的影响*

蒋振华, 李胜容, 王贤英[△]

(重庆市中药研究院, 重庆 400065)

摘要:目的 探讨不同灭菌方法对桑叶超微粉中芦丁含量的影响。方法 对同批桑叶超微粉分别采用干热灭菌、湿热灭菌、⁶⁰Co 辐照灭菌、微波灭菌、臭氧灭菌和环氧乙烷气体灭菌方法灭菌;采用高效液相色谱法测定灭菌前后的样品中芦丁含量,色谱柱为 Thermo Hypersil ODS C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为甲醇-0.5% 磷酸溶液(梯度洗脱),流速为 1.0 mL/min,检测波长为 358 nm,柱温为 25 ℃,进样量为 10 μL。结果 6 种灭菌方法均可达到灭菌效果,但不同灭菌方法对桑叶超微粉中芦丁含量的影响不同。湿热灭菌的桑叶超微粉色泽差,呈深黄绿色且结块;⁶⁰Co 辐照灭菌和微波灭菌的桑叶超微粉中芦丁含量分别为 0.155 4% 和 0.152 8%, RSD 分别为 1.86% 和 1.62%。结论 不同灭菌方法对桑叶超微粉中的芦丁含量均有影响,⁶⁰Co 辐照灭菌和微波灭菌方法对芦丁含量影响较小,结合实际生产,宜采用微波灭菌方法对桑叶超微粉进行灭菌。

关键词:桑叶超微粉;干热灭菌;湿热灭菌;⁶⁰Co 辐照灭菌;微波灭菌;臭氧灭菌;环氧乙烷气体灭菌;芦丁;高效液相色谱法;含量测定

中图分类号:R932;R282.4

文献标志码:A

文章编号:1006-4931(2021)17-0054-04

Effects of Different Sterilization Methods on the Content of Rutin in Ultrafine Powder of *Folium Mori*

JIANG Zhenhua, LI Shengrong, WANG Xianying

(Chongqing Academy of Chinese Materia Medica, Chongqing, China 400065)

Abstract: Objective To investigate the effects of different sterilization methods on the content of rutin from ultra-fine powder of *Folium Mori*. **Methods** The same batch of ultra-fine powder of *Folium Mori* was sterilized by dry heat sterilization, wet heat sterilization, ⁶⁰Co radiation sterilization, microwave sterilization, ozone sterilization and ethylene oxide gas sterilization respectively, and the content of rutin in the samples before and after sterilization was determined by the high-performance liquid chromatography (HPLC) method. The chromatographic column was Thermo Hypersil ODS C₁₈ column (250 mm×4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was methanol-0.5% phosphoric acid with gradient elution, the flow rate was 1.0 mL/min, the detection wavelength was 358 nm, the column temperature was 25 ℃, and the injection volume was 10 μL. **Results** The six sterilization methods had sterilization effects, but different sterilization methods had different effects on the content of rutin from ultra-fine powder of *Folium Mori*. The ultra-fine powder of *Folium Mori* sterilized by wet heat sterilization had poor color, dark yellow green, and caking. The contents of rutin from ultra-fine powder of *Folium Mori* sterilized by ⁶⁰Co radiation sterilization and microwave sterilization were 0.155 4% and 0.152 8% with RSDs of 1.86% and 1.62%, respectively. **Conclusion** Different sterilization methods have effects on the content of rutin from ultra-fine powder of *Folium Mori*, among which ⁶⁰Co radiation sterilization and microwave sterilization have less effect on the content of rutin. Combined with the actual production, the microwave sterilization method should be selected to sterilize ultra-fine powder of *Folium Mori*.

Key words: ultra-fine powder of *Folium Mori*; dry heat sterilization; wet heat sterilization; ⁶⁰Co radiation sterilization; microwave sterilization; ozone sterilization; ethylene oxide gas sterilization; rutin; HPLC; content determination

桑叶为桑科植物桑 *Morus alba* L. 的叶,味甘、苦,性寒,归肺、肝经,可除寒热、出汗,治劳热咳嗽、明目长发,用于治疗风热感冒、肺热燥咳、头昏头痛、目赤昏花^[1]。桑叶含有芦丁、槲皮素、异槲皮苷、黄芪苷、茵芋苷等黄酮类成分^[2]。桑叶中的总黄酮对糖尿病大鼠小肠的双糖酶、体外蛋白糖基化及低密度脂蛋白氧化都具有抑制作用^[3-5],具有降血压、抑制血糖上升、抗菌、消炎、调血脂、延缓衰老、抗肿瘤、抗氧化等功效^[6-7]。桑叶超微粉由桑叶炮制加工而成,但其中的微生物生长繁殖影响

产品质量,甚至部分有害微生物通过口服进入人体会影响患者的健康和生命安全。因此,对桑叶超微粉的灭菌方法进行研究及控制其微生物限度是必然要求^[8]。传统的灭菌方法可能破坏药物的有效成分,影响疗效;或有辐射、有机溶剂残留,影响用药安全;或能耗大、时间长,影响经济效益。灭菌时必须结合药物的化学成分、性质、剂型等综合考虑,采用有效的灭菌方法,合理运用灭菌技术^[9],既要除去或杀灭微生物,又要保证药物的质量稳定性、治疗作用及用药安全。芦丁是桑叶中黄酮类成

*基金项目:重庆市重点产业共性关键技术创新专项项目[cstc2016zdcy-ztxx10001]。

第一作者:蒋振华,男,大学本科,主管药师,研究方向为新药、食品及保健食品制剂工艺、质量标准,(电子信箱)173922060@qq.com。

[△]通信作者:王贤英,女,大学本科,主任中药师,研究方向为药品、保健食品开发及质量标准,(电子信箱)452956864@qq.com。

分之一,本研究中探讨了不同灭菌方法对桑叶超微粉中芦丁含量的影响。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

YX280B 型手提式不锈钢压力蒸汽灭菌器(上海三申医疗器械有限公司);MS205DU 型电子分析天平(精度为十万分之一),XPR6UD5 型电子分析天平(精度为百万分之一),均购自瑞士梅特勒-托利多有限责任公司;KQ-3200B 型超声波清洗机(巩义市予华仪器有限责任公司,功率为 250 W,频率为 40 kHz);M1-L213C 型美的微波炉(美的电器有限公司);Waters e2965 型高效液相色谱仪(美国沃特世仪器有限公司),配有 Waters 2489 型紫外检测器;101A-1 型数显电热鼓风干燥箱(上海浦东荣丰科学仪器有限公司);LCF-G/A-20 型壁挂式臭氧消毒机(河北兰蒂斯环保科技有限公司);SPX-150B Ⅲ型需氧菌培养箱,CJ-1S 型超净工作台,SPX-150B Ⅲ型霉菌及酵母菌恒温培养箱,均购于天津泰斯特仪器有限公司)。

1.2 试剂

甲醇(色谱纯,美国 Fisher 公司,批号为 20034);甲醇(批号为 20180901),磷酸(批号为 20180701),均为分析纯,购于重庆川东化工有限公司;芦丁对照品(中国食品药品检定研究院,批号为 100080-201811,纯度为 92.2%);环氧乙烷;胰酪大豆胨琼脂培养基(批号为 20180201),沙氏葡萄糖琼脂培养基(批号为 20180402),胰酪大豆胨液体培养基(批号为 20180503),麦康凯琼脂培养基(批号为 20180201),均购于北京三药科技开发公司;桑叶超微粉(批号为 20190501),由山东南易辰超微粉碎技术有限公司制备。

2 方法与结果

2.1 灭菌样品制备

分别用干热灭菌、湿热灭菌、辐照灭菌、微波灭菌^[10]、臭氧灭菌^[11]和环氧乙烷气体灭菌方法制备桑叶超微粉的灭菌样品。干热灭菌:烘箱 160~170℃ 灭菌 120 min;湿热灭菌:高压蒸气 121℃ 灭菌 20 min;辐照灭菌:⁶⁰Co 射线 6 kGy 辐照灭菌;微波灭菌法:灭菌功率 600 W 微波灭菌 2~4 min;臭氧灭菌:经臭氧发生器灭菌 30 min;环氧乙烷气体灭菌:经环氧乙烷灭菌 30 min。

2.2 微生物限度检查

按 2020 年版《中国药典(四部)》通则 1108 中药饮片微生物限度检查法进行试验。样品经不同方法灭菌,分别将原粉定为 1 号,干热灭菌定为 2 号,湿热灭菌定为 3 号,⁶⁰Co 辐照灭菌定为 4 号,微波灭菌定为 5 号,臭氧灭菌定为 6 号,环氧乙烷灭菌定为 7 号。微生物限度检查方法为平皿法,结果各灭菌样品均达到预期灭菌效果。详见表 1。

表 1 不同灭菌方法桑叶超微粉的微生物限度检查结果

Tab. 1 Results of microbial limit test of ultra-fine powder of *Folium Mori* with different sterilization methods

样品	性状	需氧菌总数(cfu/g)	霉菌和酵母菌总数(cfu/g)	大肠埃希菌	活菌
1号	黄绿色	25 000	1 450	未检出	未检出
2号	黄绿色	<10	<10	未检出	未检出
3号	深黄绿色,结块	<10	<10	未检出	未检出
4号	黄绿色	<10	<10	未检出	未检出
5号	黄绿色	<10	<10	未检出	未检出
6号	黄绿色	<10	<10	未检出	未检出
7号	黄绿色	<10	<10	未检出	未检出

2.3 芦丁含量测定

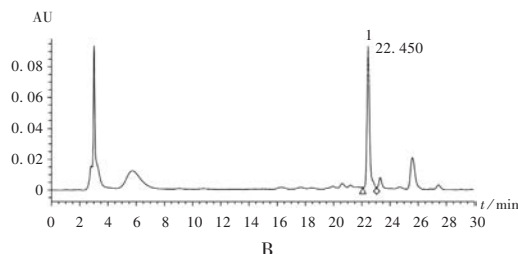
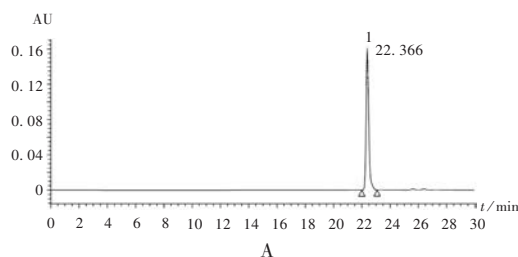
2.3.1 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱:Thermo Hypersil ODS C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:甲醇(A)-0.5% 磷酸溶液(B),梯度洗脱程序见表 2;流速:1.0 mL/min;检测波长:358 nm;柱温:25℃;检测器:紫外检测器;进样量:10 μL。在此色谱条件下的色谱图见图 1。

表 2 流动相梯度洗脱程序(%)

Tab. 2 Gradient elution procedure of mobile phase(%)

时间	流动相 A	流动相 B	时间	流动相 A	流动相 B
0.01 min	30	70	15 min	40	60
5 min	30	70	18 min	50	50
10 min	35	65			



1. 芦丁

A. 对照品溶液 B. 供试品溶液

图 1 高效液相色谱图

1. rutin

A. Reference solution B. Test solution

Fig. 1 HPLC chromatograms

2.3.2 溶液制备

取芦丁对照品 0.0250 g,精密称定,置 100 mL 容量瓶中,用甲醇定容至 100 mL,配制成质量浓度为 0.25 mg/mL

的标准贮备液。分别取 1-7 号样品 1 g,精密称定,置圆底烧瓶中,加甲醇 50 mL,加热回流 30 min,滤过,滤渣用甲醇 50 mL 同法提取 2 次,合并滤液,减压回收溶剂,残渣加甲醇溶解,转移至 25 mL 容量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,滤过,取续滤液经微孔滤膜滤过(0.45 μm),即得供试品溶液 1-7。

2.3.3 方法学考察

线性关系考察:精密吸取 0.20,0.40,1.00,2.00,4.00 mL 标准贮备液,置 10 mL 容量瓶中,加甲醇定容至刻度,得质量浓度分别为 5,10,25,50,100 μg/mL 的系列对照品溶液。按 2.3.1 项下色谱条件进样测定,以对照品溶液质量浓度为横坐标(X , μg/mL)、峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程 $Y = 18\,450X - 3\,339.4$, $R^2 = 0.999\,9$ ($n = 5$)。结果表明,芦丁质量浓度在 5~100 μg/mL 范围内与峰面积线性关系良好。

精密度试验:取对照品溶液(质量浓度为 10 μg/mL),按 2.3.1 项下色谱条件进样测定 6 次。结果的 RSD 为 1.81% ($n = 6$),表明仪器精密度良好。

稳定性试验:取 2.3.2 项下供试品溶液 1,分别于室温下放置 0,4,8,12,24,36 h 时各进样 10 μL 测定。结果峰面积的 RSD 为 1.08% ($n = 6$),表明供试品溶液在 36 h 内稳定。

重复性试验:取 1 号样品 1 g,精密称定,依法制备供试品溶液,共 6 份,按 2.3.1 项下色谱条件进样 10 μL 测定峰面积,并计算芦丁含量。结果芦丁的平均含量为 0.15%, RSD 为 1.56% ($n = 6$),表明方法重复性良好。

加样回收试验:取已知含量的 1 号样品 1 g,精密称定,共 9 份,分成 3 组,分别精密加入芦丁对照品溶液(质量浓度为 0.25 mg/mL)3.0,6.0,9.0 mL,依法制备供试品溶液。按 2.3.1 项下色谱条件进样测定,并计算回收率。结果芦丁的平均回收率为 98.12%, RSD 为 1.43% ($n = 9$)。

2.3.4 样品含量测定

分别取对照品溶液和供试品溶液 1-7 各 10 μL,按 2.3.1 项下色谱条件进样测定,并计算芦丁含量。结果见表 3。

3 讨论

由表 1 可知,6 种灭菌条件的微生物限度检查结果均符合药品微生物限度标准规定,但湿热灭菌的外观及色泽较差,其他灭菌方法的效果较好。由表 3 可知,芦丁在湿热灭菌下损失较大,其他 5 种灭菌方法对芦丁含量影响不明显。考虑到干热灭菌时间较长,辐照灭菌、臭氧灭菌及环氧乙烷灭菌存在残留问题,微波灭菌法因其灭菌时间短,热转化效率高,节约能源,符合《药品生产质量管理规范》要求,并可实现自动控制及连续化生产^[12-13]。故选择微波灭菌。

表 3 不同灭菌方法桑叶超微粉中芦丁含量测定结果(%)

Tab. 3 Content determination of rutin from ultra-fine powder of *Folium Mori* with different sterilization methods(%)

样品	芦丁含量			$\bar{X}$	RSD
	1	2	3		
1 号	0.154 0	0.159 8	0.154 2	0.156 0	2.11
2 号	0.156 6	0.160 6	0.161 6	0.159 6	1.66
3 号	0.140 9	0.145 8	0.142 3	0.143 0	1.76
4 号	0.154 4	0.158 7	0.153 2	0.155 4	1.86
5 号	0.153 5	0.150 1	0.154 9	0.152 8	1.62
6 号	0.156 3	0.152 1	0.154 2	0.154 2	1.36
7 号	0.155 8	0.151 9	0.156 7	0.154 8	1.65

本试验中对未灭菌及 6 种灭菌方法^[14-19]的样品进行了含量测定,结果显示,不同灭菌方法对桑叶超微粉的质量影响较大。因此,在生产过程中,应对直接服用的中药饮片桑叶超微粉灭菌方法的选择进行考察。以芦丁为指标性成分进行考察,方法稳定、可靠、重复性好,可作为桑叶超微粉中芦丁的含量测定方法,同时为制订中药饮片桑叶超微粉的质量标准提供参考。

试验结果表明,桑叶超微粉湿热灭菌法对桑叶超微粉芦丁含量影响较大,其他方法影响较小,而芦丁是主要药用成分之一,含量太低不能保证桑叶超微粉的质量,故不能选湿热灭菌方法灭菌;且 ^{60}Co 辐照灭菌存在辐照残留问题^[20-24],还有待进一步研究。微波灭菌时对物料内外同时进行加热,内部温度高,热传导是由内向外的,升温均匀且加热迅速,时间较短。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社,2015:297.
- [2] 佚名. 桑叶中的黄酮醇甙[J]. 国外医学:中医中药分册, 1994,16(6):35.
- [3] 俞灵莺,李向荣,方晓. 桑叶总黄酮对糖尿病大鼠小肠双糖酶的抑制作用[J]. 中华内分泌代谢杂志,2002,18(4):313-315.
- [4] 俞灵莺,李向荣,沈建根. 桑叶总黄酮对体外蛋白糖基化的抑制作用[J]. 中国公共卫生,2002,18(8):929-930.
- [5] 伦秀英,阎振武. 桑叶提取物对 LDL 氧化的抑制作用[J]. 国外医学:中医中药分册,2001,23(5):296-297.
- [6] DOI K, KOJIMA T, HARDAD M, et al. Effect of various fraction extracted from mulberry leaves on lipid metabolism in rabbits fed a cholesterol diet[J]. Nippon Shokuryo Gakkaishi, 1999, 52(2): 85-90.
- [7] LEE JS, CHOI MH. Blood glucose-lowering effects of mulberry leaf extract[J]. Yakhak Hoechi, 1995, 39(4):367-372.
- [8] 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.
- [9] 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.
- [10] 张咏梅,杨敏,陆春燕. 微波灭菌对黄芩微生物限度的影响[J]. 现代中药研究与实践,2011,25(6):48-50.