

微波灭菌对中药汤剂微生物限度的影响

于若祎¹, 苗妍¹, 施钧瀚^{1,2,3,4}, 王盼盼^{1,2,3,4}, 范雪花¹, 董峰宇¹, 桂新景^{1,2,3,4}, 李学林^{1,2,3,4*}, 刘瑞新^{1,2,3,4}

(1. 河南中医药大学第一附属医院药学部, 河南 郑州 450003;

2. 河南省中药临床应用评价与转化工程研究中心, 河南 郑州 450003;

3. 河南省中药临床药学中医药重点实验室, 河南 郑州 450003;

4. 河南中医药大学呼吸疾病中医药防治省部共建协同创新中心, 河南 郑州 450046)

【摘要】目的 考察不同微波灭菌参数对汤剂微生物限度的影响, 以探讨其应用于汤剂灭菌的可行性。**方法** 选取 14 组汤剂(普通方、含动物药方、含矿物药方、含后下药方, 共四类)煎煮后密封包装, 冷却至 25℃ 后使用 900W 微波炉进行灭菌。以灭菌时间为控制条件分为两组: 灭菌 60s 组与 90s 组, 灭菌后室温储存, 于第 1, 3, 7, 14, 21, 30 天进行性状观察, 并依据《中国药典》(2020 版)进行微生物限度检测。**结果** 第 1, 3 天, 灭菌后的 14 组汤剂均合格; 第 7 天, 灭菌 60s、90s 组合格汤剂分别为 12 组、13 组; 第 14、21 天两种灭菌时长下合格汤剂分别为 10 组、9 组; 第 30 天, 灭菌 60s、90s 组合格汤剂分别为 7 组、8 组。灭菌 90s 组需氧菌含量均显著低于灭菌 60s ($P < 0.05$), 霉菌和酵母菌含量部分组显著低于灭菌 60s 组 ($P < 0.05$), 其余组无显著性差异 ($P > 0.05$); 相同煎煮、灭菌和储存条件下, 不同类别汤剂的含菌量均无显著性差异 ($P > 0.05$)。**结论** 经微波灭菌 60s、90s 置于室温储存 30 天后分别有 50.0%、57.1% 的汤剂微生物限度符合药典规定, 其具体使用规律有待进一步探讨。

【关键词】 中药汤剂; 微波灭菌; 贮藏; 微生物限度

DOI 标识: doi:10.3969/j.issn.1008-0805.2024.10.12

【中图分类号】 R283 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1008-0805(2024)10-2381-08

中药汤剂是我国应用最早、最广泛的剂型, 其制备过程是有效成分进入人体发挥治疗作用前的重要环节。近年来, 中医药界有人提出“中医将亡于中药, 中药将亡于煎药”的说法^[1], 足以说明汤剂质量对其疗效发挥起到至关重要的作用。然而, 汤剂存在煎煮过程繁琐、携带不便、贮存时限不明等缺点, 严重影响了其应用范围 and 安全性。在临床实际应用中, 依据《医院中药饮片管理规范》《长期处方管理规范(试行)》^[2] 等管理规定, 单张中药饮片处方疗程不超过 7 天, 慢病患者可适当延长。由于汤剂煎煮繁琐、携带不便, 较多患者选择代煎汤剂^[3], 但取药后汤剂的贮存时限是影响患者居家用药安全有效的重要因素。原因主要为汤剂中含蛋白质、多糖类的药材更容易被污染, 动物类饮片则会因自身携带芽孢活化生成微生物。虽在煎煮时可以降低微生物含量, 但生产加工过程中难以完全杀灭其中的耐热微生物^[4,5]。此外, 汤剂不添加防腐剂, 天气、放置过久等外因影响会“加速”其酸败变质, 继而

影响汤剂质量。相关研究表明, 控制生产过程中微生物污染是保证中成药口服给药制剂质量的重要因素^[6,7]。因此, 亟需建立事前防控方法控制汤剂微生物限度, 保障汤剂用药安全。

常用灭菌方法主要分为物理灭菌^[8]和化学灭菌^[9,10], 其应用早、使用范围广。但传统的物理灭菌法操作复杂耗时且易破坏原材料中有机成分^[11,12]; 化学灭菌法则存在试剂使用过量和残留问题^[13]。随着微波能应用的兴起, 人们重新认识到微波的灭菌作用。微波灭菌以电磁波为加热源, 利用热效应与生物效应迅速将微生物杀灭^[14]。与传统灭菌方法相比, 微波技术具有操作便捷、耗时短、对有效成分破坏小等优势。目前, 有学者采用微波灭菌技术在丸剂^[15]、口服液体制剂^[16] 等方面进行相关研究, 鲜少将微波灭菌技术运用到汤剂。笔者前期选取 7 组处方进行未灭菌微生物限度检测, 结果表明含后下药的汤剂更易出现不达标的情况。因此, 本研究尝试以多类代表性的汤剂为研

收稿日期: 2024-02-18; 修订日期: 2024-07-25

基金项目: 国家重点研发计划中医药现代化重点专项(2017YFC1703400);

河南省中医药科学研究专项(2023ZY2026); 河南省中医药科学研究专项(2024ZY3019);

国家中医药管理局与河南省卫生健康委 2022 年部省联合开放课题张仲景传承与创新专项(GZY-KJS-2022-048-2)

作者简介: 于若祎(2000-), 女(汉族), 河南安阳人, 河南中医药大学在读硕士研究生, 主要从事中药饮片临床应用现代化关键技术研究工作。

*通讯作者简介: 李学林(1960-), 男(汉族), 河南安阳人, 河南中医药大学第一附属医院主任药师, 博士研究生导师, 硕士学位, 主要从事中药应用形式研究工作。

究载体,选用微波灭菌技术,考察 14 组处方灭菌后的微生物限度、汤剂性状,分析微波灭菌对汤剂微生物变化的影响,以期为探索汤剂灭菌新技术和保证其质量提供有益参考。

1 材料

1.1 仪器

YB50-250B 中药汤剂包装机(北京东华原医疗设备有限责任公司),HZQ-A10 电子分析天平(福建华志电子科技有限公司),BSC-1100-LIIB2 生物安全柜(北京东联哈尔仪器制造有限公司),GI80DP 立式自动压力蒸汽灭菌器(厦门致微仪器有限公司),303AB-1 型数显隔水式培养箱(上海申光仪器仪表有限公司),GZX-9070MBE 型数显鼓风干燥箱(上海博迅实业有限公司医疗设备厂),KQ-50B 超声波清洗器,PYA-DHS-BS-11 数字显示式隔水电热恒温培养箱(上海跃进医疗器械厂),MJX-260 霉菌培养箱

(宁波扬辉仪器有限公司),C22-ID30 苏泊尔电磁炉炒菜锅一体,量筒($F=1.0000$),2000mL 烧杯,90mm 无菌平皿,X3-233A 美的 900w 微波炉烤箱一体机。

1.2 试药

中药饮片(共计 44 种,见表 1);中药汤剂(规格:每袋 200 mL);胰酪大豆胨琼脂培养基(批号:20220616);胰酪大豆胨液体培养基(批号:20220830);RV 沙门菌增菌液体培养基(批号:20220810);麦康凯液体培养基(批号:20220810);麦康凯琼脂培养基(批号:20220318);沙氏葡萄糖琼脂培养基(批号:20230110);pH 7.0 氯化钠-蛋白胨缓冲液(批号:20220226)由北京奥博星生物技术有限责任公司提供;木糖赖氨酸脱氧胆酸盐琼脂培养基(批号:220314)由北京三药科技开发公司提供。中药饮片由河南中医药大学第一附属医院施钧瀚副主任药师鉴定。

表 1 44 种饮片来源信息

序号	饮片	产地	批号	序号	饮片	产地	批号
1	白芍	安徽亳州	230501	23	广藿香	广东	221004
2	白术	安徽亳州	221002	24	桂枝	广东	2211101
3	白头翁	吉林	2209290082	25	黄柏	四川	2210263
4	北柴胡	山西闻喜	230701	26	黄连片	重庆	2209023
5	蝉蜕	河南洛阳	221102	27	黄芩片	山西	2212061
6	陈皮	浙江	2212223	28	姜半夏	甘肃	2304198
7	赤芍	内蒙呼伦贝尔	230301	29	姜厚朴	四川	2303023
8	川芎	四川彭州	230301	30	麦冬	四川绵阳	221102
9	大黄	甘肃	2303293	31	墨旱莲	江苏	220713
10	大枣	河南新郑	230101	32	牡丹皮	安徽	230619
11	当归	甘肃岷县	230201	33	牛膝	河南	221108
12	党参	甘肃文县	230101	34	茜草	陕西	221209
13	地龙	广西	221102	35	秦皮	辽宁	220802
14	丁香	广西	2302271	36	青皮	浙江	2304141
15	豆蔻	广西	220606	37	生石膏	山东	2301291
16	麸炒枳实	江西宜春	230102	38	熟地黄	河南	220702
17	茯苓	安徽岳西	230302	39	新疆紫草	新疆	2302192
18	甘草片	内蒙古	230702	40	知母	河北	2303222
19	干姜片	云南曲靖	221201	41	栀子	江西抚州	230201
20	高良姜	广西	2211281	42	炙甘草	内蒙古	220726
21	葛根	安徽	2211081	43	生姜	山东潍坊	220601
22	钩藤	江西	22092610	44	枳实	江西宜春	221102

2 方法

2.1 待测中药汤剂的制备

2.1.1 煎煮

称取选定的 14 组中药处方置于烧杯内,根据课题组前期成果所得加水量公式^[17]加水(约为 4~9 倍水)浸泡 30min。将浸泡好的饮片采用电磁炉煎煮 30min,得到一煎水煎液;倒出煎煮液后按照计算重新加水再煎煮 20min,得到二煎水煎液(煎煮时,先用武火加热

至沸腾,再改用文火慢煎,并保持微沸,煎煮至规定时间)。根据中药汤剂煎煮规范^[18]中常用特殊煎煮中药饮片品种及煎煮参数表确定处方中后下药的煎煮时间。其中,豆蔻一煎同煎 1min;钩藤二煎同煎 12min;大黄二煎同煎 10min(见表 2)。处方组成见表 3,其中包含 9 组常见药处方、1 组含动物药处方、1 组含矿物药处方、3 组含后下药处方。

2.1.2 包装

二煎煎煮完成后,将二煎药液与一煎药液混合,加

热沸腾后采用中药汤剂包装机包装,包装体积为 200mL。

2.1.3 灭菌

取 14 组汤剂,每组分为两份,每组 14 个样品,共

计 196 个样品。将汤剂置在微波炉正中央的白圈内,每次取一包进行灭菌处理。功率 900W,灭菌时间分别为 60、90s,放置方法见图 1。

表 2 三种特殊煎煮中药饮片煎煮参数

中药饮片	煎煮参数	类别	后下
豆蔻	在第一煎药料煎至预定量时,投入同煎 1~2min	气味芳香,含挥发油多类	是
钩藤	在第二煎药料煎至预定量时,投入同煎 12~15min,用于抗肿胀时不后下	不宜久煎类	是
大黄	在第二煎药料煎至预定量时,投入同煎 10min,用于泻下不宜久煎	不宜久煎类	是

表 3 14 个处方组成

序号	处方名称	处方出处	处方组成	处方类别
1	小柴胡汤	《伤寒论》	北柴胡、黄芩、炙甘草、党参、姜半夏、生姜、大枣	常见药
2	桂枝汤	《伤寒论》	桂枝、芍药、炙甘草、生姜、大枣	常见药
3	半夏泻心汤	《伤寒论》	姜半夏、黄芩、干姜、党参、黄连、大枣、炙甘草	常见药
4	黄连解毒汤	《外台秘要》	黄连、黄芩、黄柏、栀子	常见药
5	四逆散	《伤寒论》	柴胡、枳实、芍药、炙甘草	常见药
6	白头翁汤	《伤寒论》	白头翁、黄柏、黄连、秦皮	常见药
7	四物汤	《太平惠民和剂局方》	当归、川芎、白芍、熟地	常见药
8	白术厚朴汤	《宣明论》卷九	白术、炙甘草、葛根、厚朴	常见药
9	苓桂术甘汤	《金匱要略》	茯苓、桂枝、白术、甘草	常见药
10	脱敏汤	干祖望方剂	紫草、茜草、墨旱莲、蝉蜕、地龙	含动物药
11	玉女煎	《景岳全书》	石膏、熟地、麦冬、知母、牛膝	含矿物药
12	大柴胡汤	《伤寒论》	北柴胡、黄芩、芍药、姜半夏、生姜、炙炒枳实、大枣、大黄	含后下药
13	柴胡清肝饮	《症因脉治》卷三	柴胡、芍药、栀子、黄芩、牡丹皮、当归、青皮、钩藤、甘草	含后下药
14	藿香汤	《圣济总录》卷二十五	藿香叶、丁香、白豆蔻*、高良姜、陈皮	含后下药

* 实验使用的豆蔻按照药典品种确认后确为方中记载的白豆蔻



图 1 灭菌摆放示意图

2.2 储存

室温(25 ± 2)℃避光储存 30d。

2.3 微生物限度检查方法

2.3.1 汤剂性状检查

分别于第 1、3、7、14、21、30 天,对所制备的中药汤剂进行肉眼观察,判断是否有变色、结块、胀袋等性状变化。

2.3.2 微生物限度检查

参照《中华人民共和国药典》2020 年版四部 0181

合剂^[20]规定标准,依据微生物限度检查法平皿法对汤剂进行非无菌产品微生物限度(《中国药典》2020 年版四部 1105,1106,1107)检查,标准如下:口服给药液体制剂每毫升需氧菌数不得大于 200 cfu · mL⁻¹,霉菌和酵母菌数不得大于 20 cfu · mL⁻¹,不得检出大肠埃希菌(控制菌),动物药不得检出沙门菌(控制菌)。取中药煎煮液充分混匀后立即吸取样品溶液 10mL,加 pH 值 7.0 无菌氯化钠蛋白胨溶液稀释至 100 mL,得 1:10 供试液;去 1:10 供试液 1mL,加 pH 值 7.0 无菌氯化钠蛋白胨溶液稀释至 10 mL,得 1:100 供试液。分别取 1:10、1:100 供试液各 1mL 加到 90 mm 的无菌平皿中,注入相应琼脂培养基后混匀凝固后倒置,每个稀释级平行做两组,培养后计数;取 pH 值 7.0 无菌氯化钠蛋白胨溶液作为空白对照,同法检测。汤剂制备并包装完成时记为第 0 天,分别于第 1、3、7、14、21、30 天的同一时间段内进行微生物限度检测。

2.3.3 微生物计数

将培养好的平皿从平板背面直接以肉眼点计,以透射光衬以暗色背景,仔细观察。尽量不漏计细小的琼脂层内及平皿边缘生长的菌落。必要时,用放大镜直接观察。若菌落极小不易辨认则延长培养时间。以两个平皿的算术平均值作为计数结果,计数后乘以其

相应稀释度即为每毫升标本中所含菌落总数。

3 结果

3.1 性状考察结果

代煎汤剂灭菌前,处方 4(黄连解毒汤)在包装冷却后便出现暗黄色絮状沉淀。经微波灭菌 60、90s 后重新混悬,冷却后沉淀再次出现。进行微生物限度检测过程中附着在锥形瓶瓶壁,吸取时堵塞移液管。第 3 天,所有汤剂煎药袋底部均有絮状沉淀出现。处方 10(含动物药:地龙、蝉蜕)和处方 11(含矿物药:石膏)的代煎汤剂与其他汤剂(除处方 4 外)相比沉淀较多,但轻轻摇晃煎药袋,可使之重新混悬,无结块产生,无颜色变化。所有代煎汤剂均未出现胀袋情况。

3.2 微生物限度检查结果

如表 4、表 5 所示,随着储存时间的增加,第 1、3 天,灭菌 60、90s 的所有汤剂微生物限度均合格;第 7 天,灭菌 60s 有汤剂超过检测限度,灭菌 90s 组均合格;

第 14 天,灭菌 90s 有汤剂超过检测限度。其中,灭菌 60s 和 90s 组均未检测出控制菌,故在表格中省略。

3.2.1 14 种中药汤剂灭菌检测结果

3.2.1.1 灭菌 60s 结果

汤剂在检测的第 1、3 天需氧菌、霉菌和酵母菌总数均未超标;第 7 天,2 组汤剂的需氧菌总数 $>200\text{ cfu}\cdot\text{mL}^{-1}$,其中 1 组霉菌和酵母菌总数 $>20\text{ cfu}\cdot\text{mL}^{-1}$;第 14 天,4 组汤剂的需氧菌总数 $>200\text{ cfu}\cdot\text{mL}^{-1}$,其中 3 组霉菌和酵母菌总数 $>20\text{ cfu}\cdot\text{mL}^{-1}$;第 21 天,5 组汤剂的需氧菌总数 $>200\text{ cfu}\cdot\text{mL}^{-1}$,霉菌和酵母菌总数 $>20\text{ cfu}\cdot\text{mL}^{-1}$;第 30 天,7 组汤剂的需氧菌总数 $>200\text{ cfu}\cdot\text{mL}^{-1}$,霉菌和酵母菌总数 $>20\text{ cfu}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

第 7 天,玉女煎、小柴胡汤的微生物限度不符合药典标准;第 14 天,微生物限度不合格汤剂增加桂枝汤、半夏泻心汤,共计 4 组;第 21 天,增加黄连解毒汤,共计 5 组;第 30 天,增加柴胡清肝饮和藿香汤,共计 7 组。见图 2。

表 4 微波灭菌 60s 各组汤剂微生物限度检测结果(̄±s) cfu·mL⁻¹

复方 序号	第 1 天		第 3 天		第 7 天		第 14 天		第 21 天		第 30 天	
	需氧菌 菌落数	霉菌和 酵母菌 菌落数	需氧菌 菌落数	霉菌和 酵母菌 菌落数	需氧菌 菌落数	霉菌和 酵母菌 菌落数	需氧菌 菌落数	霉菌和 酵母菌 菌落数	需氧菌 菌落数	霉菌和 酵母菌 菌落数	需氧菌 菌落数	霉菌和 酵母菌 菌落数
1	55±12	10±6	140±15	5±5	480±12	15±4	470±17	35±5	480±12	45±14	—	135±15
2	40±112	0±0	70±10	0±0	83±10	10±10	350±10	0±0	450±0	55±6	290±10	35±10
3	30±17	5±5	40±5	0±0	80±5	5±5	—	150±10	—	—	—	—
4	15±10	0±0	30±14	0±0	60±7	0±0	45±10	0±0	255±10	45±13	230±19	50±5
5	20±12	0±0	10±0	0±0	15±15	0±0	20±0	0±0	25±15	0±0	25±15	0±0
6	0±0	0±0	25±7	0±0	10±10	0±0	30±17	0±0	10±6	0±0	10±10	0±0
7	50±7	0±0	47±7	0±0	30±19	0±0	45±10	0±0	10±6	0±0	25±15	0±0
8	20±12	0±0	10±0	0±0	20±14	0±0	20±14	0±0	15±4	0±0	15±10	0±0
9	20±17	0±0	75±14	0±0	15±10	0±0	25±15	0±0	20±12	0±0	25±15	0±0
10	25±15	0±0	30±17	0±0	40±0	0±0	10±6	5±5	20±14	0±0	30±19	10±10
11	115±14	20±12	175±15	15±5	460±14	55±10	290±10	65±14	—	105±5	—	90±6
12	5±5	0±0	0±0	0±0	30±17	0±0	0±0	0±0	15±4.5	0±0	25±15	0±0
13	90±10	15±5	85±10	0±0	93±10	15±4	85±10	8±12	125±15	20±0	120±14	45±10
14	47±14	10±6	90±10	10±5	128±10	15±5	85±5	0±0	130±19	20±0	95±13	25±15

其中“—”代表菌总数过高无法计数;n=4

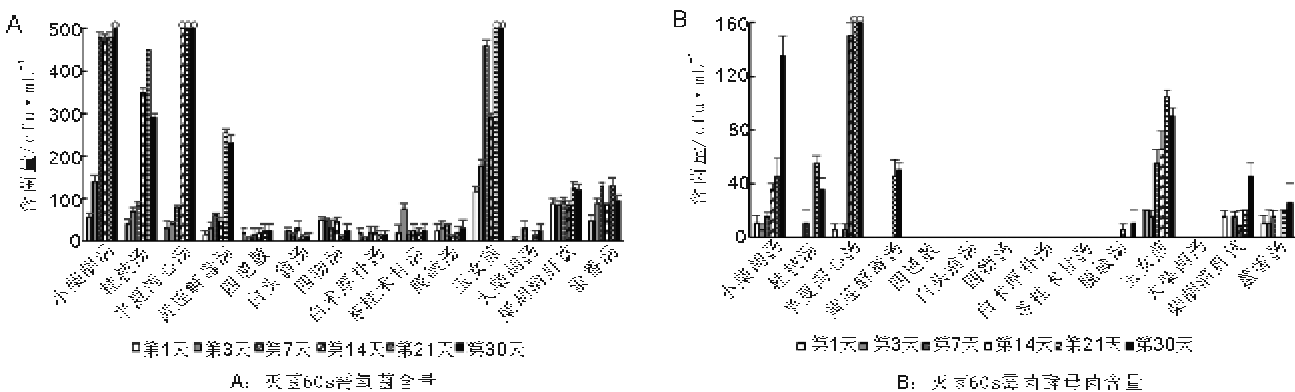


图 2 灭菌 60s 汤剂微生物限度检测结果(其中 n=4,含菌量过高无法计数的情况用“0”号表示)

3.2.1.2 灭菌 90s 结果

检测的第 1、3、7 天需氧菌、霉菌和酵母菌总数均未超标;第 14 天,4 组汤剂的需氧菌总数 $>200\text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$,其中 2 组霉菌和酵母菌总数 $>20\text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$;第 21 天,5 组汤剂的需氧菌总数 $>200\text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$,其中 4 组霉菌和酵母菌总数 $>20\text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$;第 30 天,5 组汤

剂的需氧菌总数 $>200\text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$,5 组霉菌和酵母菌总数 $>20\text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

第 14 天,玉女煎、小柴胡汤、桂枝汤、半夏泻心汤微生物限度不符合药典标准;第 21 天,微生物限度不合格汤剂增加黄连解毒汤,共计 5 组;第 30 天,增加柴胡清肝饮,共计 6 组。见图 3。

表 5 微波灭菌 90s 各组汤剂微生物限度检测结果($\bar{x} \pm s$) $\text{cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$

复方序号	第 1 天		第 3 天		第 7 天		第 14 天		第 21 天		第 30 天	
	需氧菌菌落数	霉菌和酵母菌菌落数	需氧菌菌落数	霉菌和酵母菌菌落数	需氧菌菌落数	霉菌和酵母菌菌落数	需氧菌菌落数	霉菌和酵母菌菌落数	需氧菌菌落数	霉菌和酵母菌菌落数	需氧菌菌落数	霉菌和酵母菌菌落数
1	45 ± 6	0 ± 0	25 ± 15	5 ± 5	190 ± 5	5 ± 5	210 ± 10	10 ± 6	310 ± 10	25 ± 5	—	105 ± 5
2	30 ± 17	0 ± 0	40 ± 16	0 ± 0	65 ± 0	0 ± 0	225 ± 15	0 ± 0	250 ± 12	25 ± 5	200 ± 16	25 ± 5
3	15 ± 10	0 ± 0	10 ± 6	0 ± 0	50 ± 5	5 ± 5	1110 ± 10	90 ± 10	—	—	—	—
4	0 ± 0	0 ± 0	30 ± 0	0 ± 0	30 ± 12	0 ± 0	15 ± 10	0 ± 0	205 ± 5	20 ± 0	205 ± 13	15 ± 5
5	0 ± 0	0 ± 0	5 ± 5.0	0 ± 0	10 ± 6	0 ± 0	10 ± 10	0 ± 0	15 ± 10	0 ± 0	5 ± 5	0 ± 0
6	0 ± 0	0 ± 0	20 ± 0	0 ± 0	5 ± 5	0 ± 0	15 ± 10	0 ± 0	5 ± 5	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
7	5 ± 5	0 ± 0	25 ± 7	0 ± 0	5 ± 5	0 ± 0	25 ± 15	0 ± 0	10 ± 6	0 ± 0	20 ± 12	0 ± 0
8	5 ± 5	0 ± 0	10 ± 0	0 ± 0	5 ± 5	0 ± 0	10 ± 6	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	10 ± 6	0 ± 0
9	25 ± 15	0 ± 0	32 ± 7	0 ± 0	5 ± 5	0 ± 0	15 ± 10	0 ± 0	15 ± 10	0 ± 0	15 ± 10	0 ± 0
10	5 ± 5	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	20 ± 0	0 ± 0	5 ± 5	0 ± 0	25 ± 15	0 ± 0	10 ± 10	5 ± 5
11	60 ± 10	10 ± 6	115 ± 10	10 ± 6	190 ± 10	20 ± 0	210 ± 10	30 ± 5	300 ± 16	75 ± 12	—	60 ± 12
12	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	15 ± 15	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	5 ± 5	0 ± 0
13	40 ± 19	5 ± 5	70 ± 19	0 ± 0	88 ± 0	0 ± 0	60 ± 11	0 ± 0	110 ± 10	15 ± 10	95 ± 5	30 ± 10
14	47 ± 14	5 ± 5	45 ± 10	0 ± 0	80 ± 5	5 ± 5	70 ± 17	5 ± 5	60 ± 13	15 ± 10	75 ± 15	15 ± 5

其中“—”代表菌总数过高无法计数; $n=4$

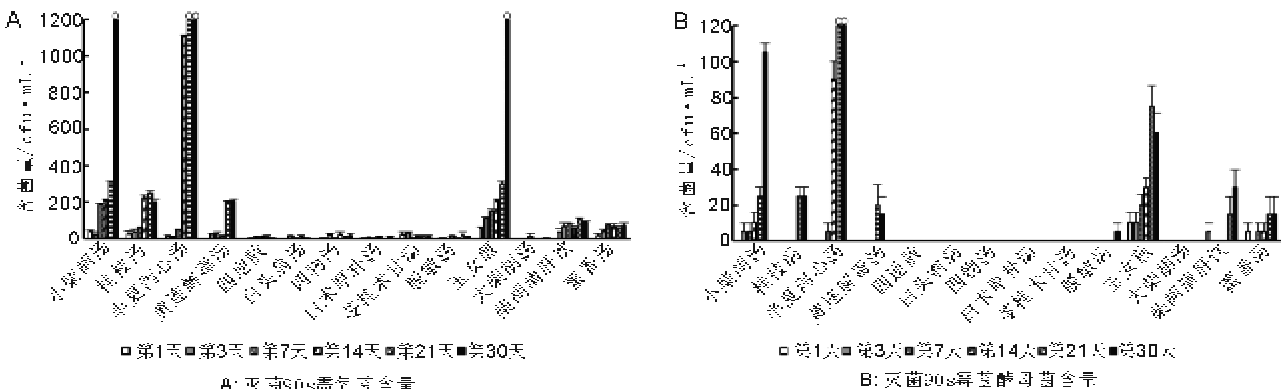


图 3 灭菌 90s 汤剂微生物限度检测结果(其中 $n=4$,含菌量过高无法计数的情况用“0”号表示)

3.2.2 两种灭菌时长结果对比

检测的第 1、3 天两组均符合标准;第 7 天,灭菌 60s 的汤剂不合格数比灭菌 90s 多 1 组;第 14 天,灭菌 60s 与灭菌 90s 的汤剂不合格数持平;第 21 天,灭菌 60s 与灭菌 90s 的汤剂不合格数持平;第 30 天,灭菌 60s 的汤剂不合格数比灭菌 90s 多 1 组。

3.2.2.1 需氧菌含量对比

随着储存时间的变化,部分汤剂的需氧菌含量过高肉眼无法统计,纳入样本数由 14 组逐渐转变为 10 组。对两种灭菌时长下的需氧菌含量进行 t 检验。第 1、3、7 天,均纳入 14 组样本($n=28$);第 14 天,纳入 12

组样本($n=24$);第 21 天,纳入 11 组样本($n=22$);第 30 天,纳入 10 组样本($n=20$)。结果表明,灭菌 60s 与 90s 的第 1、3、30 天需氧菌含量有极显著性差异($P < 0.01$);其余三个时间节点的有显著性差异($P < 0.05$)。说明两种灭菌时长条件对控制代煎汤剂需氧菌数量均具有统计学意义。

3.2.2.2 霉菌和酵母菌含量对比

随着储存时间的变化,部分汤剂的需氧菌含量过高肉眼无法统计,纳入样本数由 14 组逐渐转变为 12 组。对两种灭菌时长下的霉菌和酵母菌含量进行 t 检验。第 1、3、7 天,均纳入 14 组样本($n=28$);第 14 天,

纳入 13 组样本($n=26$);第 21 天,纳入 12 组样本($n=24$);第 30 天,纳入 12 组样本($n=24$)。结果表明,灭菌 60s 与 90s 的第 21、30 天霉菌和酵母菌含量有显著性差异($P<0.05$);第 1、3、7、14 天无显著性差异($P>0.05$)。

3.2.3 不同贮存时间节点结果对比

3.2.3.1 灭菌 60s 相邻检测天数对比

对汤剂灭菌 60s 后相邻检测天数的需氧菌、霉菌和酵母菌含量进行 t 检验。结果表明相邻检测天数中,需氧菌在第 1 天与第 3 天对比有显著性差异($P<0.05$),其余检测节点均无显著性差异($P>0.05$);霉菌和酵母菌在第 14 天与 21 天对比有显著性差异($P<0.05$),其余检测节点均无显著性差异($P>0.05$)。

3.2.3.2 灭菌 90s 相邻检测天数对比

对汤剂灭菌 90s 后相邻检测天数的需氧菌、霉菌和酵母菌含量进行 t 检验。结果表明相邻检测天数中,需氧菌含量均无显著性差异($P>0.05$);霉菌和酵母菌在第 14 天与 21 天对比有显著性差异($P<0.05$),其余检测节点均无显著性差异($P>0.05$)。

3.2.3.3 灭菌 60s 相隔检测天数对比

对汤剂灭菌 60s 后相隔检测天数(即 1 天与 7 天、3 天与 14 天、7 天与 21 天、14 天与 30 天)的需氧菌、霉菌和酵母菌含量进行 t 检验。结果显示,相隔检测天数的需氧菌均无显著性差异($P>0.05$);霉菌和酵母菌在第 7 天与 21 天、第 14 天与 30 天的有显著性差异($P<0.05$),其余检测节点均无显著性差异($P>0.05$)。

3.2.3.4 灭菌 90s 相隔检测天数对比

对汤剂灭菌 90s 后相隔检测天数(即 1 天与 7 天、3 天与 14 天、7 天与 21 天、14 天与 30 天)的需氧菌、霉菌和酵母菌含量进行 t 检验。结果显示,相隔检测天数中第 7 天与 21 天、第 14 天与 30 天的需氧菌、霉菌和酵母菌均有显著性差异($P<0.05$),其余检测节点均无显著性差异($P>0.05$)。

3.2.4 不同类别代煎汤剂结果对比

在每个贮存时间节点下,对微波灭菌后的常见药方与后下药方、含动物药、矿物药处方之间的需氧菌、霉菌和酵母菌含量进行 t 检验。结果显示,相同煎煮、灭菌和储存条件下,不同类别汤剂微生物含量无显著性差异($P>0.05$)。

4 讨论

4.1 灭菌条件与处方的确定及实验结果分析

笔者在前期预实验中根据相关参数确定以灭菌 50、70s 为梯度对含常见药、动物药的处方进行实验并检测微生物含量。前期实验结果表明,所有节点需氧菌含量微波灭菌组均显著低于未灭菌组($P<0.05$);霉菌和酵母菌含量微波灭菌部分组显著低于未灭菌组

($P<0.05$),其余组无显著性差异($P>0.05$)。由于未达到预期的储存效果,经调试后重新进行相关实验确定了包装袋平均最大承受限度为 94.6s($n=6$, $sd=0.55$)。通过结合前期结果分析重新确定灭菌参数,最终选择以灭菌 60、90s 为梯度,药液初始温度为 25℃,采用家用微波炉进行实验。基于前期的实验结果,笔者在后期实验中注重选择含后下药、动物药、矿物药代表性处方以最大程度贴合临床真实用药情况,寻找共性问题和规律,使实验结果拥有更好的应用普适性,此外,相关研究表明,低温、避光条件下更有利于抑制代煎中药汤剂微生物滋生,本研究也在此基础前提下开展微波灭菌操作^[31]。

实验结果表明:(1)灭菌 90s 和灭菌 60s 在相应时间节点进行微生物限度检测,两者的汤剂合格数目差别不大。储存 30 天后,灭菌 90s 相较于灭菌 60s 多 1 组。(2)含后下药处方中,大柴胡汤在两个灭菌时长下均保存了 30 天;柴胡清肝饮在两个灭菌时长下均保存了 21 天;藿香汤在灭菌 60s 下保存了 21 天,在灭菌 90s 下保存了 30 天。(3)灭菌后,含矿物药处方(玉女煎)微生物限度不合格或因熟地、麦冬、知母中多糖含量较高;含动物药处方(脱敏汤)中虽存在蝉蜕、地龙等动物药,但紫草、茜草、墨旱莲均具有抑菌的功效且在处方中占比较大,在第 30 天时微生物限度仍能合格。(4)常见方中,小柴胡汤、桂枝汤、半夏泻心汤、黄连解毒汤在两个灭菌时长下均为第 21 天、第 30 天不合格。尽管处方中黄芩、桂枝、柴胡、黄连等具有清热解毒功效的饮片拥有一定的抑菌作用,但大枣、炙甘草等多糖含量高的饮片也可能导致微生物含量增加。

4.2 微波灭菌技术

微波(microwave, MW)是一种波长在 0.001~1m、频率介于 300 MHz~300 GHz 之间的无线电波中一个特殊频带的简称^[32]。因其波长短、频率高而产生显著的反射,具有震荡周期短、穿透能力强等特点。在国防、科研、食品生产^[23~25]、医疗卫生^[26,27]等领域中被广泛应用。微波灭菌是微波热效应和生物效应共同作用的结果^[14],具有灭菌周期短、灭菌过程无污染、节约能源等特点。微波能的热效应主要起快速升温灭菌作用。食品、药品中的虫类和菌体会因分子极化现象吸收微波能升温从而蛋白质变性,最终失去生物活性;微波能的非热效应则是通过微波高频的电场对细胞膜的电位分布造成影响,使其膜电位、极性分子结构和离子浓度发生改变,从而改变细胞膜的通透性,使微生物体内蛋白质和生理活性物质发生变异。最终,微生物因不能进行正常新陈代谢,生长发育受阻而死亡。

由于本实验所使用的微波设备是家用微波炉,相较于工业方面所使用的隧道式微波灭菌设备和工业微波炉,存在加热不均匀、使用不安全以及辐射等问题。

(1)加热不均匀的原因主要包括电场分布不均和物品本身的介电特性^[28]。针对加热不均匀的问题,可从改变微波能量的分布、改变物品的形状尺寸等方面进行改善。如采用铝箔包裹药包尖角减少微波的过度吸收造成的温度过高、在家用微波炉内部增添模式搅波器或天线来不断改变谐振腔里微波的分布来增加电场分布的均匀性^[29]。(2)工业设备存在袋装、罐装食品药品的灭菌设备,相对于家用微波炉可灭菌品类更多更安全。笔者在使用时为安全起见,前期进行了相应的破坏性实验进行包装袋限度考察。建议后续进行实际应用时在相应限度内进行。(3)微波属于射线,存在相应的辐射。若辐射量控制不当导致微波泄露,会对操作人员造成相应伤害^[30]。工业设备研发时会加装相应的微波抑制器以达到工业微波加热设备的微波泄漏标准,家用微波炉使用过程中可通过保持距离、正确使用、缩短使用时间和定期维护检查等手段进行预防。此外,由于微波具有反射特性,微波炉内是否存在辐射残留仍需进一步考察。

4.3 中药汤剂灭菌所面临的问题

在实际生产中,造成中药汤剂微生物限度超标的因素有很多,生产环节环环相扣,各个环节都有被污染的可能。(1)在人员方面,主要体现为相关人员的不规范操作、未按相应的清洁流程进行消毒等。(2)在设备方面,设备存在死角,不易彻底清洁。(3)在物料方面,汤剂包装袋、饮片自身可能含有相应的微生物。如沙门氏菌、大肠杆菌等会引起感染、过敏反应和毒性反应等不良反应^[31]。(4)在生产过程中,中药存在特殊煎煮方式,煎煮时间不足也会导致其所含的菌未被彻底杀灭。(5)在储存时,一些厌氧微生物的生长和代谢过程中产生的酸、碱或气体等^[32]物质可能导致中药汤剂的 pH 值、溶解度、外观等发生变化,从而影响其贮存稳定性和品质。

为了解决汤剂灭菌问题,研究者依据干热灭菌法、微波灭菌法、辐照灭菌法等开展一系列探索,但不同的灭菌方法各有利弊。如传统的干热灭菌法对中药中含有的挥发油、热敏性成分等影响较大^[33];若含有寒性中药材,湿热灭菌法则可能影响其药效^[34];微波灭菌法会因电场的尖端效应^[35]而存在加热不均匀的情况;辐照灭菌法因资源有限所需成本高,且辐照剂量超标引起中药化学成分含量的变化,如赤芍所含的芍药苷明显降低^[36]。高压脉冲电场灭菌^[37]、低温等离子体灭菌法^[38]等新兴灭菌技术虽然相关研究文献报道众多,但在中药方面的研究仅限于实验室,实际转化应用不足。在灭菌工艺技术标准化、高效化的趋势下,要研发选择最适宜的灭菌工艺,可从灭菌方法融合运用、新兴灭菌技术的实际应用转化等方面着手,为中药及其制剂现代化发展提供有力保障。

综上所述,本研究基于微波灭菌技术,分别比较了不同灭菌时长、不同时间节点、不同类别代煎汤剂的微生物含量。结果显示两种灭菌时长下,灭菌 90s 需氧菌含量均显著低于灭菌 60s($P < 0.05$),霉菌和酵母菌含量部分显著低于灭菌 60s($P < 0.05$);相邻、相隔时间节点中,部分节点的含菌量有显著性差异($P < 0.05$);不同类别汤剂的含菌量均无显著性差异($P > 0.05$)。经微波灭菌 60、90s 后在室温储存 30 天,14 组汤剂中分别有 50.0%、57.1% 的汤剂微生物含量符合《中国药典》标准,说明微波灭菌技术拥有一定的效果,为汤剂灭菌提供一种新思路。微波的应用特点以及最佳保存时长有待进一步实验讨论。

参考文献:

- [1] 明汤义,赵圆圆. 中药饮片的保护与发展[J]. 未来与发展, 2020, 44(8): 79.
- [2] 国务院. 关于印发长期处方管理规范(试行)的通知[EB/OL], (2021-08-10). [2024-01-31]. https://www.gov.cn/zhengce/zhengceku/2021-08/13/content_5631140.htm.
- [3] 熊凤海. 现行煎药机问题分析与智能煎药机研发思路[J]. 中国医疗器械信息, 2018, 24(15): 38.
- [4] 范一灵,李琼琳,房蕊,等. 上海地区 10 种中药饮片微生物污染情况研究[J]. 中草药, 2015, 46(13): 1908.
- [5] 黄玉兰,李镇涛,吕谦. 中药制剂微生物污染的因素及对策[J]. 药物评价研究, 2011, 34(3): 204.
- [6] 冒兴建,闫玉梅,秦建. 中药口服制剂微生物限度检查不合格的原因及解决办法[J]. 中国现代药物应用, 2011, 5(19): 130.
- [7] 刘鹏,战宏利,严倩倩,等. 中成药口服给药制剂及其原料药材生物污染相关性分析[J]. 药物分析杂志, 2014, 34(6): 1068.
- [8] 李建彬. 几种常用的物理消毒灭菌法[J]. 现代畜牧科技, 2020, 48(11): 76.
- [9] 康超超,王学成,伍振峰,等. 基于物理化学及生物评价的中药生药粉灭菌技术研究进展[J]. 中草药, 2020, 51(2): 507.
- [10] 李扬. 基于 HPLC 指纹图谱研究 ~(60)Co- γ 射线辐射灭菌对除脂生发片化学成分的影响[J]. 中国药师, 2022, 25(7): 1271.
- [11] 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.
- [12] 张立姜,林玲,梁伟洪,等. 干热、湿热、辐照对龙胆和秦艽化学成分和灭菌效果的比较研究[J]. 中药新药与临床药理, 2016, 27(5): 692.
- [13] 张秋海,孙增玉. 辐照灭菌对黄芩中化学成分的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(5): 72.
- [14] De-La-Hoz Antonio, Díaz-Ontiveros Ángel, Moreno Andrés. Microwave in organic synthesis. Thermal and non-thermal microwave effects[J]. Chem Soc Rev, 2005, 34(2): 164.
- [15] 马俊峰,王随国. 丸剂生产中应用微波于灭菌机的探讨[J]. 中成药, 2005, 27(10): 1225.
- [16] 余涛,高景华,冯淑明,等. 微波在大黄附子口服液制备中的应用[J]. 中成药, 2004, 26(10): 122.
- [17] 张璐,桂新景,孟非,等. 中药饮片吸水率变化规律及中药复方汤剂相对密度预测模型研究[J]. 中国中药杂志, 2020, 45(15): 3681.
- [18] 中华中医药学会. 中药汤剂煎煮规范[M]. 北京:中国标准出版社, 2021.

- [19] 王银甲,郭会丽. 苍耳子散联合脱敏汤在治疗小儿鼻炎中的应用价值[J]. 中国药物滥用防治杂志, 2022, 28(7): 958.
- [20] 国家药典委员会. 中国药典, 四部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 26.
- [21] 安裕婷,杨新建,张善革,等. 代煎中药汤剂微生物限度研究[J]. 医药导报, 2021, 40(11): 1538.
- [22] 杜金涛,赵保槐,曾壮,等. 微波技术在分子筛材料合成及应用中的研究进展[J]. 石油炼制与化工, 2023, 54(8): 127.
- [23] 韩春然,薛清卓,运世友,等. 微波杀菌对果汁品质的影响[J]. 食品安全质量检测学报, 2022, 13(15): 4917.
- [24] 张玲,张莉,薛倩倩,等. 微波场非热效应对巴氏杀菌三文鱼脂质品质的影响[J]. 食品安全导刊, 2023, 17(24): 98.
- [25] 王蒲栋,孔阳华,张艳玲,等. 杀菌技术的作用机制及在食品领域中的应用[J]. 中国酿造, 2022, 41(2): 1.
- [26] 罗锦程,李淑媛,周强,等. 感染性医疗废物非焚烧处理技术述评——以微波消毒技术为例[J]. 环境与可持续发展, 2020, 45(4): 136.
- [27] 周小莉,郭存霞,刘德杰,等. 可移动式医疗废物微波消毒处理设施的应急处置实践[J]. 环境卫生工程, 2021, 29(6): 23.
- [28] Vaidyanbal R, Jayas DS. Non-uniform Temperature Distribution During Microwave Heating of Food Materials—A Review[J]. Food Bioproc Technol, 2010, 3(2): 161.
- [29] Lin SX, Yoshiko O, Mika F, et al. Investigation and modeling of temperature changes in food heated in a flatbed microwave oven[J]. J Food Eng, 2014, 131(JUN.): 142.
- [30] 颜志红. 超声微波连续逆流提取、微波灭菌、真空带式干燥技术及设备的特点[J]. 机电信息, 2010, 10(8): 18.
- [31] 程斌,庞瑞亮,王若晨,等. 不同源沙门氏菌对小鼠致病力的比较与毒力基因检测[J]. 中国人兽共患病学报, 2013, 29(5): 460.
- [32] 王忠永,郑生香,周铁丽,等. 反相高效液相色谱法测定厌氧菌有机酸代谢产物[J]. 中国微生态学杂志, 2007, 19(6): 527.
- [33] 谭伯森,李惠琴,黄凤婷. 不同灭菌法对续断中川续断皂苷含量的影响[J]. 现代医院, 2012, 12(4): 72.
- [34] 周长城,王平. 大黄药材灭菌方法的探讨[J]. 新疆中医药, 2010, 28(2): 55.
- [35] 罗恩泽. 尖端效应及其数学表达式[J]. 大学物理, 1993, 12(6): 20.
- [36] 孙建宇,陈红海,李兆奎,等. $^{60}\text{Co}-\gamma$ 射线辐照对赤芍和黄芩有效成分的影响[J]. 中国药师, 2007, 10(8): 777.
- [37] 王惠惠,莫列平,柏建玲,等. 高压脉冲电场灭菌对木瓜果酒中维生素 C 损失的影响[J]. 酿酒科技, 2018, 39(9): 22.
- [38] 肖蓉,杨艳兰. 多酶清洗液超声清洗联合低温等离子灭菌法对医疗器械清洗合格率、灭菌效果的影响[J]. 护理研究, 2023, 37(10): 1878.

Effect of microwave sterilization on microbial limit of traditional Chinese medicine decoction

YU Ruo-yi¹, MIAO Yan¹, SHI Jun-han^{1,2,3,4}, WANG Pan-pan^{1,2,3,4}, FAN Xue-hua¹, DONG Feng-yu¹, GUI Xin-jing^{1,2,3,4}, LI Xue-lin^{1,2,3,4*}, LIU Rui-xin^{1,2,3,4}

(1. The First Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine Department of Pharmacy, Zhengzhou, 450003, China; 2. Henan Province Engineering Research Center for Clinical Application, Evaluation and Transformation of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450003, China; 3. Henan Key Laboratory for Clinical Pharmacy of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450003, China; 4. Collaborative Innovation Center for Prevention and Treatment of Respiratory Diseases with Traditional Chinese Medicine, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China)

Abstract; Objective To investigate the effects of different microwave sterilization parameters on the microbial limit of decoction, and to explore the feasibility of its application in the sterilization of decoction. **Methods** Fourteen groups of decoctions (common prescription, animal-containing prescription, mineral-containing prescription, and post-treatment prescription, a total of four categories) were selected and sealed after decoction. After cooling to 25 °C, they were sterilized using a 900W microwave oven. The sterilization time was used as the control condition and divided into two groups: sterilization 60 s group and 90 s group. After sterilization, they were stored at room temperature. The traits were observed on the 1st, 3rd, 7th, 14th, 21st and 30th days, and the microbial limit test was carried out according to the 'Chinese Pharmacopoeia' (2020 edition). **Results** On the 1st and 3rd day, the 14 groups of decoctions after sterilization were all qualified; on the 7th day, 12 groups and 13 groups were sterilized for 60 s and 90 s respectively. On the 14th and 21st days, the qualified decoctions under the two-sterilization time were 10 groups and 9 groups, respectively. On the 30th day, the combined decoctions of 60 s and 90 s were 7 groups and 8 groups, respectively. The content of aerobic bacteria in the 90 s sterilization group was significantly lower than that in the 60 s sterilization group ($P < 0.05$). The content of mold and yeast in some groups was significantly lower than that in the 60 s sterilization group ($P < 0.05$), and there was no significant difference in the other groups ($P > 0.05$). Under the same decoction, sterilization and storage conditions, there was no significant difference in the bacterial content of different types of decoctions ($P > 0.05$). **Conclusion** After 60 s and 90 s of microwave sterilization and storage at room temperature for 30 days, 50.0 % and 57.1 % of the microbial limits of the decoction met the requirements of the pharmacopoeia, and the specific use rules needed to be further explored.

Key words: Traditional Chinese medicine decoction; Microwave sterilization; Storage; Microbial limit

(责任编辑:张秀兰)