

舒肝丸辐照灭菌剂量的设定及辐照后其 对大鼠肝功能的评价试验

姚庆完^{1,2} 刘清芳¹

¹ (苏州大学医学部公共卫生学院 苏州 215123)

² (昆山疾病预防控制中心 昆山 215301)

摘要 探索舒肝丸辐照灭菌剂量, 及辐照后其对大鼠肝功能的影响, 为辐照灭菌舒肝丸的临床安全应用提供实验依据。测定舒肝丸初始污染菌, 经钴源辐照灭菌后, 测定 D_{10} 值及 SD; 用辐照灭菌后的舒肝丸对大鼠进行灌胃给药, 测定大鼠血液生化指标, 观察辐照的舒肝丸对大鼠生化指标的影响。本次实验舒肝丸初始污染菌范围在 50—1800 CFU/g, D_{10} 值为 1.81 kGy, 经计算辐照灭菌剂量为 11.322 kGy, 确定灭菌保证水平为 10^{-3} , 辐照后的舒肝丸对实验大鼠肝功能指标无明显损害作用。舒肝丸辐照灭菌剂量为 11.322 kGy, 经 12 kGy 辐照后的舒肝丸对实验大鼠肝功能指标无明显损害作用。

关键词 舒肝丸, 辐照灭菌, D_{10} 值, 灭菌剂量, 肝功能影响

中图分类号 R817, R144.1

舒肝丸为较常用药, 其载入《中国药典》2000年版一部, 具有舒肝养胃, 理气止痛的功效, 多用于肝郁气滞, 胸肋胀满, 胃脘疼痛, 嘈杂呕吐, 嗳气泛酸等。中药不可避免带有微生物污染, 药品必须经灭菌合格后才能进入市场销售。由于传统灭菌方法的不足, 辐射灭菌以其灭菌快速、彻底、无残留、对成分破坏小等特点, 已逐步应用于中药的灭菌处理。

近年来医疗保健产品的辐照灭菌在我国得到了很大的发展, 根据国际上安全地降低辐射灭菌剂量的思路, 采用公式法进行了舒肝丸最低辐照灭菌剂量研究。为探讨辐照灭菌的舒肝丸性能指标是否改变, 有无异常毒性, 以满足临床用药安全, 实验观察大鼠连续 60 d 口服辐照灭菌舒肝丸后的状态 (60 d), 并取上述实验中各组大鼠血液, 按常规方法检测血液生化各项指标。

1 实验材料和方法

1.1 样品来源

舒肝丸, 由某中药厂提供, 共 8 个批号, SD 大鼠, 由苏州大学医学院实验动物中心提供。

1.2 初始污染菌的检测

1.2.1 初始污染菌计数 从 8 个批号的舒肝丸中随机抽样 15 瓶, 每瓶中取出 1.0 g, 在无菌条件下研成粉末后, 与 99 mL 无菌生理盐水混合均匀, 从中吸取 1 mL 作倾注法培养, 于 35℃ 培养 72 h 后进行菌落数计数, 计算出细菌总数 (参照 GB4789.2-2010 食品卫生微生物检验: 菌落总数测定^[1])。另取样接种培养基, 在 25℃ 下培养 5 d 进行霉菌培养、计数菌落数, 计算出霉菌总数 (参照 GB4789.15-2010 食品卫生微生物检验: 霉菌和酵母菌计数^[2])。

1.2.2 初始污染菌谱的分析 将培养所得细菌按文献分类标准^[3]进行初步分类, 根据菌落的形态、大小、色素等特点进行涂片, 革兰氏染色, 镜检。以 G^+ 球菌、 G^+ 杆菌、霉菌、 G^- 球菌、 G^- 杆菌分别统计, 构成图谱。

1.3 钴源

由苏州大学辐照技术研究所提供。强度为 2.22×10^{15} Bq。吸收剂量按 EN552 规定要求测量。

1.4 D_{10} 值及 SD (灭菌剂量) 的测定

经活菌计数后, 初始污染菌数最高的二个批号

江苏高校优势学科建设工程资助项目

第一作者: 姚庆完, 男, 1982 年 8 月出生, 2005 年毕业于江苏大学, 医学检验专业, 主管检验师

通讯作者: 刘清芳, Email: qfliu@suda.edu.cn

收稿日期: 初稿 2011-11-17, 修回 2011-12-30

的样品各 5 g, 经 6 kGy 剂量辐照处理后, 随机抽取不同批号舒肝丸各 1 g, 在无菌操作室内研磨, 置入 (需氧 / 厌氧) 培养基中, 32℃ 下培养 72 h 后, 取适量培养液接种于无菌营养琼脂平皿; 32℃ 下培养 72 h, 再将此纯培养菌用比浊法配成 2.1×10^7 /mL 悬液 5 mL, 在室温下分别以 4、8、12、16 和 20 kGy 剂量进行辐照, 各取 0.5 mL 菌悬液用营养琼脂作倾注接种于 2 个无菌平皿, 32℃ 下培养 72 h 后活菌计数。根据韩友圻等^[4]推荐的方法计算 D_{10} 值, 并根据公式 $SD=D_{10}1g(N_0/N)$ ^[5] 计算辐照灭菌剂量。

1.5 动物实验

1.5.1 分组 健康 SD 大鼠分笼适应性饲养 5 d 后, 随机分为 4 组, 每组 32 只, 雌雄各半。舒肝丸设 3 个剂量组, 对照组用等体积蒸馏水 (10 mL/kg) 灌服。按规定剂量于每天上午 8:00—10:00 给药。

1.5.2 给药途径和方式 灌胃, 10 mL/kg, 每周给药 7 d, 连续给药 60 d。

2 结果

2.1 初始污染菌数

经检测, 8 个批号的舒肝丸初始污染菌数详见表 1。

Table 1 Initial counts contaminated by bacteria of the Shu-Gan Wan

Lot	Count of bacteria (CFU/pieces)		Average (CFU/pieces)
	Anaerobic & aerobic	Mildew	
2010-03-05	1100	500	1800
	1600	400	
2010-03-06	500	400	850
	700	100	
2010-03-07	600	200	600
	300	200	
2010-03-08	300	<100	300
	100	200	
2010-03-09	<100	200	250
	100	200	
2010-03-10	200	<100	200
	200	<100	
2010-03-11	<100	100	100
	<100	100	
2010-03-12	<100	100	50
	<100	<100	
Total	5600	2700	8300
Mean (CFU/pieces)	350	168.75	518.75

表 1 为 8 个批号的舒肝丸初始污染菌数。表中显示, 8 个批号样品中初始污染菌数最高是 1800 CFU/g, 最低 50 CFU/g, 平均 519 CFU/g。

2.2 初始污染菌谱

8 个批号舒肝丸的初始污染菌谱分布详见表 2。

Table 2 Distribution of the initial bacterial contamination					
Lot	G ⁺ Cocci	G ⁺ Bacillus	Mildew	G ⁻ Cocci	G ⁻ Bacillus
2010-03-05	1000	100	500	<100	<100
	1600	<100	400	<100	<100
2010-03-06	300	200	400	<100	<100
	700	<100	100	<100	<100
2010-03-07	400	100	200	<100	<100
	300	<100	200	<100	<100
2010-03-08	300	<100	<100	<100	<100
	100	<100	200	<100	<100
2010-03-09	<100	<100	200	<100	<100
	100	<100	200	<100	<100
2010-03-10	200	<100	<100	<100	<100
	<100	200	<100	<100	<100
2010-03-11	<100	<100	100	<100	<100
	<100	<100	100	<100	<100
2010-03-12	<100	<100	100	<100	<100
	<100	<100	<100	<100	<100
Total	5000	600	2700	—	—
Proportion / %	60.241	7.229	32.53	—	—

图 1 为检出细菌的菌谱图，图中显示该样品的初始污染菌以 G⁺球菌为最多，占 60%，其次为霉菌，占 33%，再为 G⁺杆菌 占 7%，G⁻球菌以及 G⁻杆菌最少，在本次检测中均未检出。

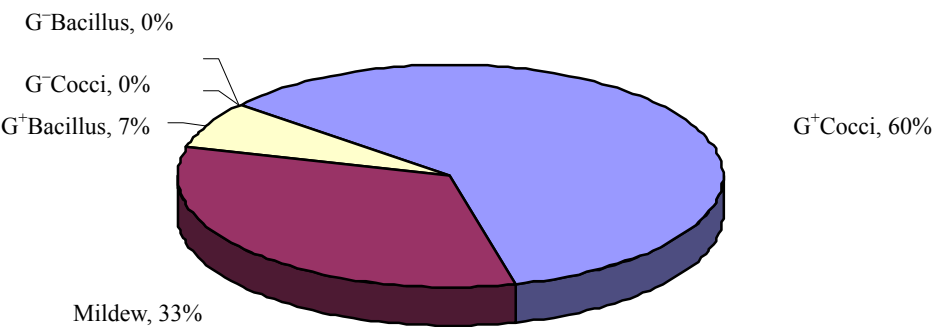


Fig.1 Bacteria distribution

2.3 D₁₀ 值及 SD

6 kGy 剂量照后的两批样品，经增菌、分离、纯培养及革兰氏染色后，发现系同一菌种，为 G⁺

芽胞杆菌，故设定 D₁₀ 值及 SD 值时即采用该菌种，见表 3。

Table 3 The number of bacteria survival after irradiation with different absorbed doses

Radiation does/ kGy	Viable count (CFU/0.5mL)		Concentration of viable after-irradiation (CFU/mL)	Lgy
4	25000	26900	51900	4.715
8	614	608	1222	3.087
12	2	0	2	0.301
16	0	0	0	—
20	0	0	0	—

经线性回归及统计法进行相关计算后，得 $a=7.1152$ ， $b=-0.5518$ ， $r=-0.9987$ 故该直线回归方程为： $1\text{Gy}=7.1152-0.5518x$ ，即如图 2 所示。

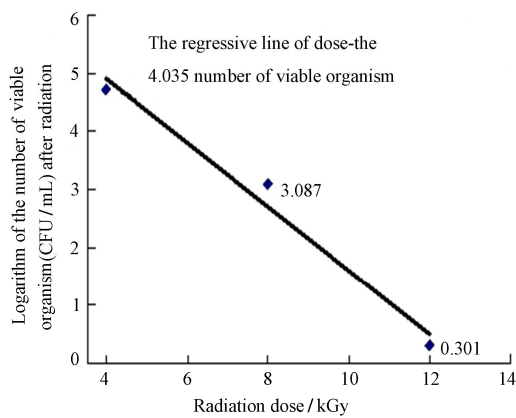


Fig.2 Does-the number of viable

因为 $r_{(3)0.05}$ ，单侧=0.988，所以 $|r| > r_{(3)0.05}$ 单侧， $p<0.05$ ，说明该辐照剂量与指示菌存活数的常用对数值之间存在显著性的直线关系。故 $D_{10}=1/|b|$

$= 1/|-0.5518| = 1.81\text{kGy}$ ， $SD=D_{10}1g(N_0/N) = 1.81\times 1g(1800/10^{-3})= 11.322\text{kGy}$ 。

由此可见，该舒肝丸的最大初始污染菌数 1800CFU/g， D_{10} 值为 1.81 kGy，所以当 SAL 为 10^{-3} 时最低灭菌剂量为 11.322 kGy。本次辐照剂量取 12 kGy。

2.4 辐照灭菌后舒肝丸对大鼠血液生化各项指标及肝功能影响

大鼠灌服辐照灭菌的舒肝丸 60 d 后，按照《全国临床检验操作规程》（第 3 版）标准检测大鼠采血后的常规生化指标，如总胆红素，谷丙转氨酶，谷草转氨酶，碱性磷酸酶，尿素氮，肌酐，葡萄糖。服用辐照后舒肝丸的大鼠血液生化各项指标与对照组相比未见有明显差异，均在正常范围内。其主要肝功能指标无明显差异 ($p>0.05$)，详见表 4。采用 SAS9.1 (SAS Institute inc, Cary, NC. USA) 统计软件分析。

Table 4 The impact on blood biochemical parameters of rats fed with Shu-Gan Wan for 60 d (n=10, $\bar{x} \pm s$)

Project	Control	Low-does	Middle-does	High-does
TBIL (μmol/L)	3.17±1.15	2.96±0.92	3.20±0.51	3.25±0.54
ALT (IU/L)	32.52±8.12	33.31±6.50	32.17±7.12	34.12±8.55
AST (IU/L)	86.33±12.16	88.15±10.04	87.12±12.42	89.31±12.92
ALP (IU/L)	56.18±13.37	54.33±12.15	56.04±16.16	59.27±18.31
UREA (mmol/L)	7.03±2.45	7.15±1.96	6.98±3.21	7.28±2.05
CREA (μmol/L)	72.11±13.25	70.85±14.15	75.25±9.38	74.28±10.18
GLU (mmol/L)	6.05±0.60	5.00±0.80	5.62±1.26	6.64±1.12
A (g/L)	25.73±2.70	27.22±2.75	27.29±3.16	26.12±3.27
G (g/L)	30.50±4.72	28.25±4.29	33.11±3.60	33.09±4.22
A/G	0.87±0.203	0.974±0.11	0.831±0.112	0.735±0.127

3 讨论

舒肝丸采用电离辐射法进行灭菌时, 必须设定灭菌剂量。关于中药辐射灭菌剂量的设定方法很多, 如 25 kGy 剂量法、AAMI (美国医疗器械促进协会) 剂量设定法、改良 AAMI 剂量设定法、Darbord 法、公式剂量法。由于采用 AAMI 法进行剂量设定工作量大, 要求条件高, 所以我国与日本普遍采用公式剂量设定法, 其最大优点是简便, 与 AAMI 的 B1 法比较^[6], 证明是可行的, 所得结果与 AAMI 法相近, 所以本实验在参照以前研究的基础上, 选定用公式法设定舒肝丸的辐射灭菌剂量 (SD)。因为公式法用单一指标菌的抗力为依据, 方法简单实用。故所得灭菌剂量一般小于 25 kGy, 因此它对于降低辐照灭菌剂量, 节约能源, 提高工效都有重要的意义。本实验结果再次证明了它的可行性, 该推荐辐照灭菌剂量 11.322 kGy 与常用的剂量 25 kGy 相比较, 降低了 51.472%。

另外, 初始污染菌谱显示, G^+ 球菌及霉菌是污染舒肝丸的主要菌种, 故生产厂家可使用能有效杀灭这两种细菌的消毒剂, 消除有利于这两种细菌生长的生产条件及环境, 以降低初始污染菌数, 减少辐照剂量, 提高经济效益。本次实验中还发现不同批号的产品, 含菌量有较大不同。这也从侧面提示了文明生产 (GMP) 及文明辐照^[7,8] (CRP) 的重要性。

本次实验结果表明: 给药 60 d 后, 各剂量组与对照组相比, 各项血液生化指标未见有明显异常, 提示辐照灭菌后的舒肝丸对实验大鼠不产生明显的肝毒性; 由于条件限制, 未能对辐照后舒肝丸的成分含量进行逐一检测。据 ^{60}Co γ 射线在中药方面辐照灭菌应用的相关文献^[9], ^[10] 中可以发现, 其对多数的药材成分不产生明显影响, 辐照后是否会对其医学效用产生影响仍需进一步研究。

参考文献

- 1 155066. 1-40144. GB 4789. 2-2010 食品安全国家标准 食品卫生微生物学检验. 菌落总数测定[M]. 北京: 中国质检出版社, 2010: 1-5
155066. 1-40144. GB 4789. 2-2010 National food safety standard Food microbiological examination. Aerobic plate count [M]. Beijing: China Zhijian Publishing House, 2010: 1-5
- 2 155066. 1-40148. GB4789. 15-2010 食品安全国家标准 食品卫生微生物学检验. 霉菌和酵母计数[M]. 北京: 中国质检出版社, 2010: 1-5
155066. 1-40148. GB4789. 15-2010 National food safety standard Food microbiological examination. Enumeration of moulds and yeasts [M]. Beijing: China Zhijian Publishing House, 2010: 1-5
- 3 ISO11737-1: Sterilization of medical devices- microbiological methods-part1: Estimation of population of microorganisms on product[s] 2006; 5-16
- 4 韩友圻. D_{10} 值的含义与计算方法[J]. 中国消毒学杂志, 1990, 7(3): 58
- HAN Youqi. Meaning of D_{10} value and method of calculation [J]. Chinese Journal of Disinfection, 1990, 7(1): 58
- 5 李晓华, 刘梅芳, 龙慈凡. 3 种剂型中成药中大肠杆菌对 γ 射线敏感性研究[J]. 安徽农业科学, 2007, 35(21): 6456-6467
- LI Xiaohua, LIU Meifang, LONG Cifan. Studies on the sensitivity of e.coli to γ -rays in three forms of chinese medicine [J]. Anhui Agri Sci, 2007, 35(21): 6456, 6467
- 6 李凤梅, 钱思敏, 罗萍, 等. 确定电离辐射灭菌剂量方法的比较[J]. 中国消毒学杂志, 1993, 10(2): 75
- LI Fengmei, QIAN Simin, LUO Ping, et al. Comparison of different methods for determination of sterilizing dosage of ionizing radiation [J]. Chinese Journal of Disinfection, 1993, 10(2): 75
- 7 Brinston R, Miller A, Deeley C. Developments in radiation sterilization [J]. J Med Device Technol, 2008, 19(2): 36-37
- 8 Harries J. Practical experience of microbiological validation of sterilization [J]. J Med Device Technol 2003, 14(3): 18-21
- 9 孙波, 施新琴, 张桂征, 等. 用 ^{60}Co γ 射线对全蚕粉复合物辐照灭菌后的保质效果[J]. 蚕业科学, 2008, 34(2): 366-369
- SUN Bo, SHI Xinqin, ZHANG Guizheng, et al. Effects of ^{60}Co γ -radiation sterilization on the silkworm powder compound [J]. Canye Kexue, 2008, 34(2): 366-369
- 10 雷曦, 申鸿. ^{60}Co γ 射线辐照贮藏中药材对其主要成分的影响[J]. 中国药房, 2002, 13(2): 119-120
- LEI Xi, SHEN Hong. ^{60}Co γ -ray irradiation affect storage of its main ingredients of Chinese medicines [J]. China Pharmacy, 2002, 13(2): 119-120

The determination of absorbed doses for sterilization of shu-ganwan and evaluation for effects of irradiated shu-ganwan on liver function of rat

YAO Qingwan^{1,2} LIU Qingfang¹

¹(School of Public Health, Soochow University, Suzhou 215123, China)

²(Center for Disease Control and Prevention of Kunshan, Kunshan 215301, China)

ABSTRACT The absorbed dose of irradiation sterilization for Shu-Gan Wan and the effects of irradiated Shu-Gan Wan on rat liver function was investigated to provide the scientific basis for its clinical safety applications. The amount range of contaminating bacteria in original Shu-Gan Wan was determined before irradiation and the D_{10} & SD were calculated after irradiation. The irradiated Shu-Gan Wan were given to the rats and the biochemical items of liver were measured before and after-irradiation. The experimental results show that the amount range of contaminating bacteria count of the Shu-Gan Wan is 50-1800 CFU/g, the D_{10} value is 1.81 kGy and the minimum bactericidal dose has been calculated to be 11.322 kGy. The ^{60}Co radiation dose for sterilization of Shu-Gan Wan has been suggested to be 11.322 kGy and irradiated Shu-Gan Wan has no significant damage to liver function of the rat.

KEYWORDS Shu-Gan Wan, Radiation sterilization, D_{10} value, Bactericidal does, Impact on liver function

CLC R817, R144.1