

当归原生粉乙醇灭菌工艺优化及其品质比较研究

康超超, 王学成*, 伍振峰*, 万娜, 李远辉, 况弯弯, 杨明
江西中医药大学 现代中药制剂教育部重点实验室, 江西 南昌 330004

摘要:目的 研究确定当归原生粉乙醇灭菌的最优工艺条件并对其品质进行研究。方法 以灭菌率为考察指标,乙醇用量、乙醇体积分数、灭菌温度、灭菌时间为因素,在单因素试验的基础上,采用响应面法对灭菌工艺条件进行优化;以菌含量、挥发油提取率及阿魏酸含量为指标,评价优化的乙醇灭菌工艺,以及湿热灭菌法及干热灭菌法对当归原生粉灭菌前后品质的影响。结果 最优的乙醇灭菌工艺为乙醇用量 34%、乙醇体积分数 80%、灭菌温度 78 ℃,灭菌率达 99.59%;3 种不同灭菌方式的灭菌率为乙醇灭菌法 > 湿热灭菌法 > 干热灭菌法;乙醇灭菌的当归原生粉挥发油提取率相比未处理组提高了 94.44%,且所含的阿魏酸仅减少 8%,而湿热灭菌及干热灭菌处理后挥发油提取率分别下降了 55.56% 及 100%,且阿魏酸完全被破坏。结论 响应面法优化的乙醇灭菌工艺能保证当归原生粉微生物含量达要求,并且品质较常规灭菌法优,有望替代当归原生粉的常规灭菌技术。

关键词: 当归原生粉;乙醇灭菌;响应面法;灭菌率;挥发油;阿魏酸;反向高效液相色谱

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)06-1341-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.06.012

Optimization of ethanol sterilization technology for *Angelicae Sinensis Radix* and comparison of its quality

KANG Chao-chao, WANG Xue-cheng, WU Zhen-feng, WAN Na, LI Yuan-hui, KUANG Wan-wan, YANG Ming
Key Laboratory of Modern Preparation of Traditional Chinese Medicine, Ministry of Education, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China

Abstract: Objective To optimize the conditions of the ethanol sterilization technology for *Angelicae Sinensis Radix* (ASR) primary powder and compare of its quality. **Methods** With the sterilization rate as the index and ethanol usage, ethanol concentration, sterilization temperature and sterilization time as factors, the response surface methodology based on the single-factor experiments was employed to optimize the ethanol sterilization process conditions. With the microbial content, extraction rate of volatile oil and the content of ferulic acid as the indexes, the effect of optimized ethanol sterilization process, the moist heat sterilization method and the dry heat sterilization method on the quality of the sterilization before and after of ASR primary powder were evaluated. **Results** The optimal parameters of ethanol sterilization technology were as follows: dosage of ethanol of 34%, ethanol concentration of 80% and sterilization temperature of 78 ℃, the sterilization rate was 99.59%. Comparing with the moist heat sterilization method and the dry heat sterilization method, ethanol sterilization method had some advantages, such as higher sterilization rate and better overall yield. Compared with the untreated product, the extraction rate of volatile oil increased 94.44% and the content of ferulic acid decreased 8% after the ethanol sterilization, while decreased 55.56% and 100% of extraction rate of volatile oil after the moist heat sterilization and the dry heat sterilization, respectively; And ferulic acid was destroyed completely. **Conclusion** The microbial indicators reached the requirement and the quality in chemical composition of ASR primary powder treated with the optimization of the ethanol sterilization process by the response surface method is better than that of conventional sterilization methods. It is expected to be an alternative to

收稿日期: 2018-12-12

基金项目: 江西省教育厅科技项目(GJJ160859);江西省卫计委科技项目(2016A044);江西中医药大学重点学科青年教师培养计划项目(2016jzzdxk007);江西民族传统药现代科技与产业发展协同创新中心基金(JXXT201403017);江西省杰出青年人才项目(20162BCB23035)

作者简介: 康超超(1993—),女,在读研究生,研究方向为中药新剂型与新技术/中药制药装备研究。

Tel: (0791)87118658 E-mail: kangchaochao11@163.com

*通信作者 王学成,男,讲师,研究方向为中药制药技术与装备。Tel: (0791)87118658 E-mail: wangxcd@126.com

伍振峰,男,副教授,研究方向为中药新剂型与新技术/中药制药装备研究。Tel/Fax: (0791)87118108 E-mail: zfwu527@163.com

conventional sterilization methods of ASR primary powder.

Key words: *Angelicae Sinensis Radix* primary powder; ethanol sterilization; response surface method; sterilization rate; volatile oil; ferulic acid; RP-HPLC

当归为伞形科植物当归 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels 的根, 入肝、心、脾经, 药性甘、辛、温, 具有补气活血、调经止痛、抗老防老、润肠通便的功效^[1-2]。当归原生粉是阿魏化痞膏、艾附暖宫丸、当归补血丸、当归补血胶囊等众多组方中的常用组成药, 药材打粉入药往往携带大量微生物, 需要进行灭菌处理以保证制剂微生物含量在《中国药典》2015 年版所限定的范围之内^[3-5]。然而, 目前在实际生产中对生粉入药的中药原料常采用湿热蒸汽或辐照方式进行灭菌, 湿热蒸汽灭菌法在高温高压的条件导致药材中的有效成分分解, 从而影响中药品质, 降低疗效^[6-12]; 辐照灭菌可能会引起中药化学成分、生物活性物质破坏^[7], 导致含水量越高的中药有效成分的辐解也愈大, 从而影响药物的疗效^[13], 尤其是辐照剂量导致的安全性问题存在较大争议^[14-16]。乙醇灭菌法是指以一定体积分数乙醇作为灭菌剂, 直接在原料药材上喷洒或在封闭容器内熏蒸的灭菌操作。相关研究报道^[17-19], 乙醇灭菌法可以显著减少中药饮片微生物的含量, 由于灭菌温度较低能最大限度地保全样品中的热敏性成分和易挥发性成分, 从而进一步保证了药效。并且乙醇作为中药制剂过程中常用的溶剂, 被广泛应用于提取、醇沉、成型等单元操作, 同时也是医疗领域常用的一种消毒灭菌剂。但是目前运用该法对中药原生粉灭菌的研究不多, 因此亟需进一步研究和挖掘乙醇灭菌技术应用于中药原生粉灭菌的理论和应用价值。故本研究以当归原生粉为研究对象, 与常规灭菌技术对比研究, 对乙醇灭菌技术的优势进行探讨, 以期乙醇灭菌法用于中药原生粉灭菌提供参考。

1 仪器与材料

1260 型高效液相色谱仪, 美国安捷伦公司; 高速粉碎机, 北京环亚天元机械技术有限公司; 药典筛, 长沙市思科仪器筛筛厂; 电热鼓风干燥箱, 上海博迅实业有限公司医疗设备厂; 电子天平, 上海光正医疗仪器有限公司; DZF-6050 型真空干燥箱, 上海博迅实业有限公司医疗设备厂; SZ-93A 自动双重纯水蒸馏器, 上海亚荣生化仪器厂; LDZM 立式压力蒸汽灭菌器, 上海申安医疗器械厂; KDM 型控温电热套, 鄞城华鲁电热仪器有限公司; 挥发油提取器, 自制, 见图 1。

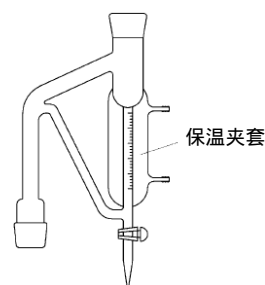


图 1 自制挥发油提取器

Fig. 1 Self-made extractor of volatile oil

当归 (批号 1708008) 由江西樟树天齐堂中药饮片有限公司提供, 经江西中医药大学杨明教授鉴定为伞形科植物当归 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels 的干燥根; 阿魏酸对照品, 批号 160102, 质量分数 98%, 购自重庆高仁生物科技有限公司; 二甲苯, 批号 1501082, 购自西陇化工股份有限公司; 玫瑰红钠琼脂培养基 (批号 20150714)、营养琼脂 (批号 20161117)、pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液 (批号 20170301) 均购自青岛高科园海博生物技术有限公司; 无水乙醇、甲醇、乙腈为色谱纯, 水为自制双蒸水, 其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 阿魏酸的定量测定方法^[1]

2.1.1 色谱条件 填充剂为十八烷基硅烷键合硅胶; 流动相为乙腈-0.085%磷酸溶液 (17 : 83); 检测波长为 316 nm; 柱温 35 。

2.1.2 对照品溶液制备 取阿魏酸对照品适量精密称定, 置于棕色量瓶中, 加 70% 甲醇即得 0.012 g/L 的对照品溶液。

2.1.3 供试品溶液制备 取当归样原生粉 0.2 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 70% 甲醇 20 mL, 密塞, 称定质量, 加热回流 30 min, 放置冷却, 继续称定质量, 用 70% 甲醇补足减失的质量, 摇匀、静置, 取上清液、滤过, 取续滤液, 即得。

2.1.4 线性关系考察 精密吸取阿魏酸对照品溶液 2、4、8、12、16、20 μL, 按“2.1.1”项下色谱条件进样测定, 建立标准曲线。

以阿魏酸平均峰面积积分为纵坐标 (Y), 质量浓度为横坐标 (X) 进行线性回归, 得阿魏酸回归方程为 $Y = 2\ 510\ X - 1.356\ 2$, $r^2 = 0.999\ 9$, 线性范围为 0.024 ~ 0.240 μg。

2.2 灭菌率测定

采用平板计数法对制备的样品菌总数进行测定,该法出自《中国药典》2015 年版四部 1105 通则项下的非无菌产品微生物限度检测法,计算灭菌率^[20]。

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

2.3 当归原生粉灭菌方法

2.3.1 当归原生粉制备 取当归饮片粉碎过六号筛制得当归原生粉,备用。

2.3.2 乙醇灭菌 随机称取 20 g 当归原生粉,量取一定量相应体积分数的乙醇溶液,采用等量递加混合法^[21]在烧杯中通过玻璃棒进行混合。将混合后样品平均分配至 2 组具塞锥形瓶中,放入设置一定温度的恒温干燥箱,放置一段时间后,移至真空干燥箱,设置温度 70 ℃、真空度 0.09 MPa,干燥时间 0.5 h。标记样品。

2.3.3 湿热灭菌 按《中国药典》2015 年版四部 1421 通则项下的湿热灭菌法,鉴于当归原生粉热不稳定性,选用湿热灭菌条件为 121 ℃ × 15 min。取 100 g 当归原生粉均匀平铺于托盘中,再用牛皮纸包裹放置在立式蒸汽灭菌柜中,按上述选定的程序进行灭菌。之后,放入真空干燥箱设置温度 70 ℃,抽真空,干燥时间 2 h。

2.3.4 干热灭菌 按《中国药典》2015 年版四部 1421 通则项下的干热灭菌法,鉴于当归原生粉热不稳定性,选用干热灭菌条件为 160 ℃ × 30 min。取 100 g 当归原生粉均匀平铺于托盘中,再用牛皮纸包裹放置在干热灭菌柜中按上述选定的条件进行灭菌。之后,放入真空干燥箱设置温度 70 ℃,抽真空,干燥时间 30 min。

2.4 挥发油提取方法

称取 100 g 当归粉,装入 2 L 圆底烧瓶中,加 10 倍量水及数粒玻璃珠,先常温浸泡 2 h,采用水蒸气蒸馏法,通过带保温结构的改进挥发油提取器提取挥发油,加热提取 8 h 后收集油状物,即为当归挥发油^[22]。按公式计算挥发油提取率^[20]。

挥发油提取率 = 挥发油体积 / 当归粉质量

2.5 乙醇灭菌工艺单因素考察

2.5.1 乙醇用量对灭菌率的影响 考察不同用量 (15%、20%、25%、30%、35%) 的乙醇对灭菌率的影响,其他条件为灭菌温度 70 ℃、乙醇体积分

数 75%、灭菌时间 1.5 h,按“2.3.2”项下的灭菌方法进行灭菌处理。结果不同乙醇用量下的灭菌率分别为 87.34%、96.58%、97.99%、99.41%、97.66%。随着乙醇用量的增加,灭菌率增大,当乙醇用量为 30% 时,灭菌率最大可达 99.41%,乙醇用量继续增加,灭菌率有下降趋势。且由灭菌率变化趋势可知,乙醇用量对灭菌率的影响明显,综合考虑后期乙醇回收时间及成本,乙醇用量选择 25%。

2.5.2 乙醇体积分数对灭菌率的影响 考察不同体积分数 (55%、65%、75%、85%、95%) 的乙醇对灭菌率的影响,其他条件为乙醇用量 25%、灭菌温度 70 ℃、灭菌时间 1.5 h,按“2.3.2”项下的灭菌方法进行灭菌处理。结果不同体积分数乙醇的灭菌率分别为 94.38%、97.77%、99.21%、99.32%、96.86%。随着乙醇体积分数的增加,灭菌率随之缓慢增大,之后乙醇体积分数再增加,灭菌率有下降趋势。根据乙醇的灭菌机制,可知其体积分数为 75% 时既能使细菌蛋白质变性又有最佳渗透性,灭菌效果最佳^[23]。当乙醇体积分数为 85% 时,灭菌率最大可达 99.32%,这可能是由于当归原生粉本身含有一定的水分。由灭菌率变化趋势可知,乙醇体积分数对灭菌率的影响明显。

2.5.3 灭菌温度对灭菌率的影响 考察不同灭菌温度 (25、40、55、70、85 ℃) 对灭菌率的影响,其他条件为乙醇用量 25%、乙醇体积分数 75%、灭菌时间 1.5 h,按“2.3.2”项下的灭菌方法进行灭菌处理。结果不同灭菌温度的灭菌率分别为 85.57%、89.25%、96.25%、99.66%、99.77%。随着灭菌温度的增加,灭菌率随之急剧增大,当灭菌温度为 70 ℃ 时,灭菌率可达 99.66%,之后灭菌温度再增加,灭菌率保持平稳,没有增大趋势。且由灭菌率变化趋势可知,灭菌温度对灭菌率的影响明显。考虑能耗问题,灭菌温度应保持 70 ℃ 左右。

2.5.4 灭菌时间对灭菌率的影响 考察不同灭菌时间 (0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 h) 对灭菌率的影响,其他条件为乙醇用量 25%、乙醇体积分数 75%、灭菌温度 70 ℃,按“2.3.2”项下的灭菌方法进行灭菌处理。结果不同灭菌时间的灭菌率分别为 97.61%、98.76%、99.55%、99.60%、99.40%。由灭菌率变化趋势可知,灭菌时间对灭菌率的影响较小,当灭菌时间为 1.5 h 时灭菌率最大可达 99.55%。

2.6 响应面法优化乙醇灭菌工艺

2.6.1 响应面分析法因素水平的选取及试验设计

在单因素的基础上, 确定灭菌时间为 1.5 h, 采用 Box-Behnken 响应面法做进一步优化^[24-27]。通过单因素试验确定响应面法试验设计的因素为乙醇用量 (A)、乙醇体积分数 (B)、灭菌温度 (C), 再根据 Box-Behnken 设计的中心组合实验设计原理, 以灭菌率为指标, 采取 3 因素 3 水平的响应面分析法进行试验设计, 第 1、3、5、13、14 次实验为 5 次重复的中心点实验, 用于考察模型的误差。响应面分析实验设计及灭菌率的响应值见表 1。

表 1 响应面法试验设计与结果

试验号	A/%	B/%	C/	灭菌率/%
1	30 (0)	85 (0)	70 (0)	96.88
2	30	75 (-1)	55 (-1)	82.45
3	30	85	70	97.27
4	25 (-1)	95 (+1)	70	82.37
5	30	85	70	98.05
6	35 (+1)	95	70	78.45
7	35	85	85 (+1)	99.61
8	25	75	70	80.50
9	30	75	85	94.15
10	30	95	85	89.86
11	30	95	55	63.13
12	25	85	55	73.09
13	30	85	70	97.27
14	35	75	70	99.22
15	30	85	70	97.27
16	35	85	55	85.57
17	25	85	85	96.49

2.6.2 回归模型的建立及方差分析 利用 Design-Expert.8.05b 统计软件设计拟合, 对表 1 进行多项式回归分析, 以灭菌率 (Y) 为响应值对编码自变量的二次多项回归方程为 $Y = 97.35 + 3.8 A - 5.31 B + 9.48 C - 5.66 AB - 2.34 AC + 3.76 BC - 2.96 A^2 - 9.25 B^2 - 5.70 C^2$ 。该模型的回归方差分析和显著性检验结果如表 2 所示, 模型 F 值为 388.36, 且 $P < 0.001$ 说明模型极其显著, 所得回归方程中各自变量对响应值的影响极显著。由表 2 可知, A、B、C、AB、AC、BC、 A^2 、 B^2 、 C^2 对响应值是极显著的, 且各因变量与响应值的影响不是简单的线性关系, 3 个因素两两之间对响应值有极强的交互作用。决定系数为 0.998 0, 说明方程的因变量与全体自变量间

表 2 方差分析

Table 2 Variance analysis

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	1 850.30	9	205.59	388.36	<0.000 1
A	115.52	1	115.52	218.22	<0.000 1
B	225.89	1	225.89	426.71	<0.000 1
C	719.53	1	719.53	1 359.22	<0.000 1
AB	128.14	1	128.14	242.06	<0.000 1
AC	21.90	1	21.90	41.37	0.000 4
BC	56.48	1	56.48	106.68	<0.000 1
A^2	36.90	1	36.90	69.70	<0.000 1
B^2	360.48	1	360.48	680.95	<0.000 1
C^2	136.69	1	136.69	258.22	<0.000 1
残差	3.71	7	0.53		
失拟项	2.98	3	0.99	5.43	0.067 8
净误差	0.73	4	0.18		
总离差	1 854.01	16			

线性关系显著, 响应值的变化有 95.06% 来源于所选自变量, 即乙醇用量、乙醇体积分数、灭菌温度, 实验误差小, 可以利用该模型对当归原生粉的乙醇灭菌效果进行分析。模型的失拟项 F 值为 5.43, 且 $P > 0.05$, 则失拟项相对于绝对误差并不显著, 说明该回归方程对试验的拟合良好。因此可用该回归方程对当归原生粉的乙醇灭菌率进行分析预测。

2.6.3 响应曲面分析与优化 根据回归方程, 固定其中 1 个因素为中间值, 做出响应值在剩余 2 个因素交互作用下构成的一个三维空间曲面^[28], 即做出本模型的响应曲面及等高线图见图 2。

根据本回归方程, 固定灭菌温度、乙醇体积分数、乙醇用量分别为中间值 70%、85%、30%, 做出乙醇用量和乙醇体积分数、乙醇用量和灭菌温度、乙醇浓度和灭菌温度 2 个因素的交互图 (图 2)。从图中可知乙醇用量与响应值灭菌率呈正相关, 乙醇用量越大, 响应值越大; 随着乙醇体积分数增加, 响应值灭菌率为一曲面, 响应值先增大后减小, 在乙醇浓度 80% 左右响应面存在极大值, 这可能与乙醇自身的灭菌机制有关, 当乙醇体积分数过高使得对细菌的渗透性减弱, 阻止乙醇进入细菌体内造成蛋白质变性, 导致灭菌率降低; 灭菌温度与响应值也呈正相关, 它的值越大, 响应值也越大。从曲面的坡度进行分析, 3 个曲面都比较陡峭, 但是图 2-b 相对图 2-a、c 而言曲面平缓, 说明 3 个因素两两之间的交互作用明显, 且 3 个因素对响应值的影响顺

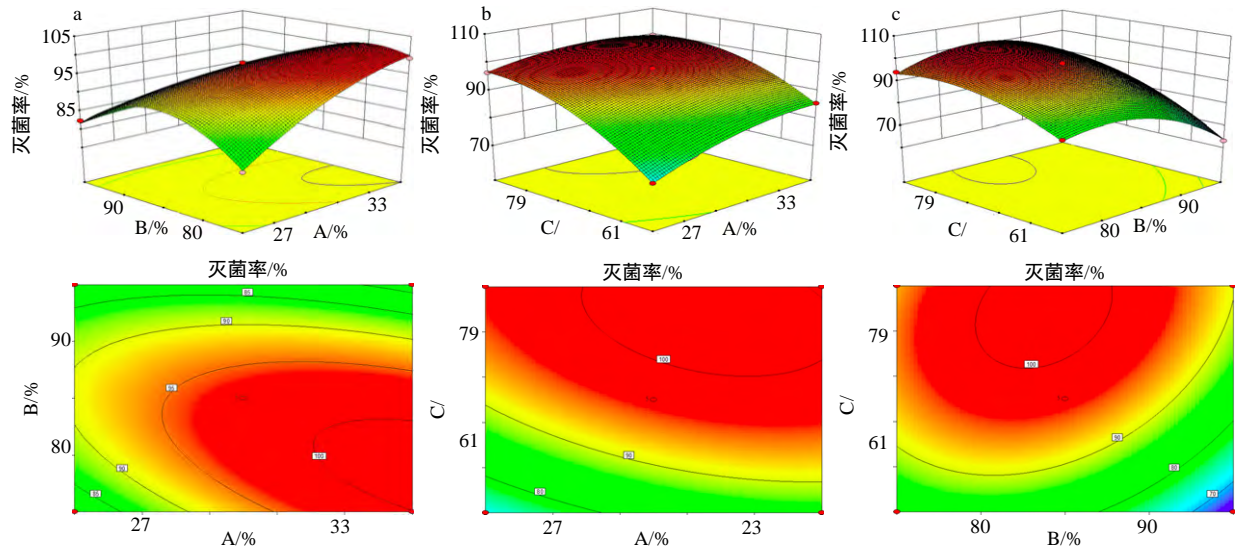


图 2 当归原生粉乙醇灭菌工艺优化三维响应面图和二维等高线图

Fig. 2 Optimization of three-dimensional response surface and two-dimensional contour map for ethanol sterilization technology of ASR

序为 $C > B > A$ ，这与方差分析是一致的。图 2-a 中等高线图的形状为椭圆形，表现为在乙醇用量较少时，乙醇体积分数对灭菌率影响显著，说明在乙醇用量较少的情况下，提高乙醇体积分数可以显著提高灭菌率；当乙醇用量较多的情况下，即使提高乙醇的体积分数，灭菌率也得不到明显提升，反而降低。这种现象的产生可能与当归原料自身所含水分和乙醇灭菌机制有关，乙醇用量较小时，与物料混合，物料中的水分起稀释作用，降低了物料中微生物实际接触到的乙醇量，而当乙醇用量较多时，物料水分的稀释作用影响不显著。

2.6.4 最优提取工艺确定及验证实验 通过 Design-Expert.8.05b 统计软件分析，预测回归模型的最优灭菌工艺为乙醇用量 34.39%，乙醇体积分数 80.47%，灭菌温度 77.55℃，此时预测微生物全部被灭活。考虑到实际过程中的可行性，对最优灭菌工艺的理论值进行修正为乙醇用量 34%，乙醇体积分数 80%，灭菌温度 78℃。

依据修正的最优工艺条件进行验证实验，共进行 4 次实验，实际测得的平均灭菌率为 99.59%，相对误差为 3.02%，表明验证实测值与预测值无显著性差异。所以，采用响应面法优化的当归原生粉的灭菌工艺真实可靠，具有实际意义。

2.7 乙醇灭菌法与不同灭菌方式的对比

2.7.1 当归菌含量对比 各取 100 g 当归原生粉分别按照“2.3”项进行灭菌处理，然后按上述平板计数法进行微生物含量检测，结果见表 3。3 种灭菌方

表 3 不同灭菌方式处理后当归原生粉的菌含量及灭菌率
Table 3 Bacterial content and sterilization rate of ASR primary powder after treatment with different sterilization methods

灭菌方式	菌含量/(cfu·g ⁻¹)	灭菌率/%
乙醇灭菌	10.0	99.38
湿热灭菌	52.5	96.76
干热灭菌	125.0	92.31

法均可达到药典规定的原生粉的微生物限度，微生物含量排序依次为乙醇灭菌 < 湿热灭菌 < 干热灭菌，说明以菌含量为指标，乙醇灭菌效果优于其他灭菌方式。

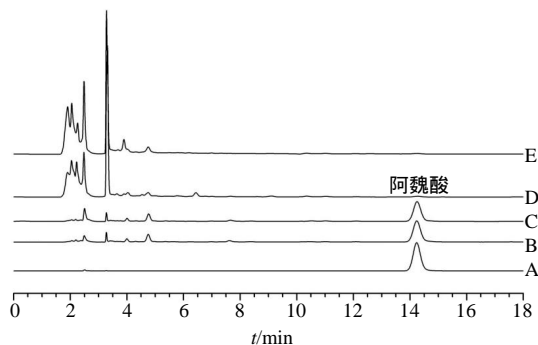
2.7.2 挥发油提取率对比 按“2.4”项下挥发油提取方法分别对未处理、乙醇灭菌、湿热灭菌及干热灭菌的当归原生粉进行挥发油提取，不同灭菌方式处理后当归挥发油颜色及提取率见表 4。结果表明，不同灭菌方式处理当归原生粉后挥发油的颜色均为

表 4 不同灭菌方式处理后当归挥发油性状及提取率
Table 4 Characters and extraction rate of volatile oil of ASR primary powder by different sterilization methods

样品	挥发油颜色	挥发油体积/mL	当归总质量/g	提取率/%
未处理	淡黄色	0.18	100	0.18
乙醇灭菌	淡黄色	0.35	100	0.35
湿热灭菌	淡黄色	0.08	100	0.08
干热灭菌	淡黄色	0.00	100	0.00

淡黄色，而挥发油提取率有较大差异，其中乙醇灭菌处理较未处理样品挥发油提取率提高了 94.44%，而湿热灭菌和干热灭菌处理较未处理样品挥发油提取率分别下降了 55.56% 及 100%，造成此差异的原因可能是乙醇灭菌过程中，灭菌温度低，不易导致挥发油的挥发，加上有机溶剂的萃取作用，使得挥发油易于溶出粉体，从而提高了提油率，湿热灭菌和干热灭菌均在高温的条件灭菌，极易导致挥发性成分的破坏和挥发^[7]。

2.7.3 阿魏酸含量对比 分别精密吸取阿魏酸的对照品溶液与当归供试品溶液各 20 μL ，注入液相色谱仪，按“2.1.1”项下色谱条件测定，样品含量根据干燥品计算，结果阿魏酸的含量不得低于 0.050%。按“2.1.1”项下的色谱条件对不同处理方式当归原生粉阿魏酸含量进行测定，色谱图见图 3。结果表明，当归原生粉未处理及乙醇灭菌处理后阿魏酸质量分数分别为 0.920 5、0.846 9 mg/g，而湿热灭菌及干热灭菌处理后阿魏酸完全被破坏，且乙醇灭菌后当归中阿魏酸含量较未处理样仅降低 8.00%，说明乙醇灭菌的方式能够最大程度保留有效成分阿魏酸。



A-阿魏酸对照品 B-未处理样 C-乙醇灭菌样 D-湿热灭菌样 E-干热灭菌样

A-reference substance of ferulic acid B-untreated sample
C-sample of ethanol sterilization D-sample of moist heat sterilization E-sample of dry heat sterilization

图 3 不同灭菌方式处理后当归样品 RP-HPLC 图

Fig. 3 RP-HPLC chromatography of ASR primary powder by different sterilization methods

3 讨论

常规的湿热灭菌和干热灭菌是应用最久和最广泛的灭菌方法，2 种常规灭菌法在处理药材方面有灭菌效果可靠、成本低、设备简单等独特优势，但 2 种热处理法处理含挥发油、易氧化成分的热敏感药材带来的危害逐渐受到重视，尤其针对原生粉的

灭菌处理，前者易造成药材细粉板结，后者由于空气导热性能差造成对粉体的穿透差且不均匀^[7]，影响灭菌后原生粉品质。乙醇作为一种绿色无毒无害的消毒剂，应用范围十分广泛。因此，本研究考察了一种低温高效乙醇灭菌法用于当归原生粉的灭菌，发现乙醇浓度 80% 时灭菌效果最佳，较乙醇作为消毒剂的浓度 75% 稍高，可能是由于当归原生粉内存有一定量的水分，稀释了乙醇，从而使得实际与微生物接触的乙醇浓度为 75% 左右。

响应面法是采用多元二次回归的方法将函数作为估计工具，研究因素与响应值之间、因素与因素之间交互作用的方法，通过对拟合后的回归方程进行分析寻找最优工艺参数，结果直观便于分析，且试验预测值能更好的考察参数合理性和试验设计的准确性，采用非线性模型拟合，在中心点进行重复试验以提高试验精度，可信度高，可以更好地处理离散水平值，克服一般的线性模型设计无法找出整个区域上因素的最佳组合和响应值而导致偏差的缺点，充分考虑到各因素的交互作用，设计方法简单，试验次数少，克服正交设计试验次数较多、工作量大且费时费力的缺点。但是响应面法仍有其局限性，该方法的前提是设计的试验点应包括最佳的试验条件，如果试验点的选取不当，响应面优化法不能得到很好的优化结果^[25-27,29]。因此本实验先进行单因素考察选取合适的因素和水平，确保最优工艺在响应面法设计的试验点中，然后采用响应面法优化当归原生粉最佳乙醇灭菌条件，并根据实际情况进行修正，即乙醇用量 34%、乙醇体积分数 80%、灭菌温度 70 $^{\circ}\text{C}$ ，在此条件下灭菌率可达 99.59%，与理论值相接近，表明该模型能较好地优化乙醇灭菌工艺，且本工艺具有可行性。当归原生粉经不同灭菌方式处理前后的灭菌率、挥发油提取率及阿魏酸含量比较研究表明，乙醇灭菌方式的灭菌效果更佳，挥发油提取率不降反升，也最大程度保证有效成分阿魏酸不受破坏，显著提高了灭菌后当归原生粉的品质。由于乙醇灭菌技术具有绿色环保，灭菌率高，温度及能耗低等优点，为其在当归原生粉灭菌工艺的应用奠定了基础，有望成为常规灭菌技术的替代技术。但是针对某些特殊中药，乙醇灭菌工艺是否与中药“酒炙”炮制工艺过程存在一定程度的异同，即灭菌工艺是否导致一些中药材药性的改变尚不明确，因此，乙醇灭菌技术对于其他中药原生粉的适宜性有待进一步深入研究。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] 杨英来, 胡芳, 刘小花, 等. 当归补气活性部位的谱效关系研究 [J]. 中草药, 2013, 44(23): 3346-3351.
- [3] 周友华, 王谷洪, 费翼城, 等. 连续式过热蒸汽灭菌技术在中药粉体生产中的应用 [J]. 机电信息, 2018, ??(8): 20-22.
- [4] 范一灵, 李琼琼, 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): 1908-1913.
- [5] 王睿陟, 李世文. 黄芩粉的干热灭菌工艺研究 [J]. 中草药, 2013, 44(15): 2092-2096.
- [6] 严丹, 袁星, 吴纯洁, 等. 中药饮片灭菌的研究现状与思考 [J]. 中草药, 2016, 47(8): 1425-1429.
- [7] 冯少俊, 伍振峰, 杨明, 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] 张萍萍. 中药灭菌新方法 [J]. 化学工程与装备, 2013(8): 186-188.
- [9] 马方励. 常用灭菌技术及其对中药制剂质量的影响 [J]. 中华中医药学刊, 2010, 28(12): 2640-2642.
- [10] 陈金雅, 邓小英, 刘春彩, 等. 压力蒸汽不同灭菌方式、干燥时间与灭菌效果的相关性研究 [J]. 实用临床医药杂志, 2013, 17(14): 154-156.
- [11] 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.
- [12] 谭伯森, 李惠琴, 黄凤婷. 不同灭菌法对续断中川续断皂苷 VI 含量的影响 [J]. 现代医院, 2012, 12(4): 72-73.
- [13] 王二兵, 赵正保, 曲婷丽. ^{60}Co 辐照灭菌对止咳立效口服液主要成分的影响 [J]. 中成药, 2013, 35(9): 2056-2058.
- [14] 张立雯, 江英桥, 林彤, 等. 中药辐照检测研究现状概述 [J]. 中药材, 2011, 34(3): 482-487.
- [15] 陈佳, 金红宇, 田金改, 等. ^{60}Co - γ 射线灭菌后中药材中的辐照残留考察 [J]. 药物分析杂志, 2012, 32(9): 1694-1696.
- [16] 曾翠梅, 林春颖, 黄凤婷. 辐照灭菌工艺对熟地黄中梓醇含量的影响 [J]. 海峡药学, 2013, 25(10): 59-60.
- [17] 王丽萍, 杨金华, 陈天朝. 乙醇蒸气灭菌中药饮片的方法探讨 [J]. 中国药房, 2012, 23(35): 3308-3309.
- [18] 吕鹏, 白明学, 陈天朝. 中药固体制剂乙醇蒸汽灭菌探讨 [J]. 中国中医药现代远程教育, 2014, 12(17): 152-154.
- [19] 杨金华, 施钧瀚. 乙醇气体灭菌法在我院中药制剂中的应用研究 [J]. 中医研究, 2011, 24(1): 28-31.
- [20] 王学成, 伍振峰, 杨明, 等. 臭氧与硫熏处理后当归品质变化情况的比较 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(3): 36-40.
- [21] 李江, 杨星钢, 荆恒攀, 等. 星点设计-效应面法优化银杏叶总黄酮双层渗透泵控释片处方 [J]. 中草药, 2014, 45(12): 1702-1708.
- [22] 张小飞, 詹娟娟, 徐传福, 等. 当归挥发油提取工艺优化及其乳化芳香成分分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(5): 27-31.
- [23] 李锡岩. 酒精浓度高不等于消毒作用强 [J]. 家庭医学, 2005(3): 25.
- [24] 宋艺君, 郭涛, 朱亚亚, 等. 响应面法优化醋延胡索微波炮制工艺研究 [J]. 中草药, 2017, 48(20): 4261-4267.
- [25] 宋佳, 黄飞龙, 段树卿, 等. Plackett-Burnman 设计联合 Box-Behnken 设计-效应面法优化心神宁片的提取工艺 [J]. 中草药, 2016, 47(3): 430-435.
- [26] 于森, 柏云娇, 代岐昌, 等. 响应曲面法优化文殊兰中生物碱的提取工艺 [J]. 中草药, 2013, 44(10): 1286-1289.
- [27] 陈敬, 温庆果, 刘韶, 等. 正交设计与响应面法优化壳聚糖对莲子心提取液除杂工艺对比研究 [J]. 中草药, 2012, 43(11): 2183-2188.
- [28] 栾庆祥, 赵杨, 周欣, 等. 单因素试验结合响应面分析法优化杜仲最佳提取工艺 [J]. 药物分析杂志, 2013, 33(5): 859-865.
- [29] 苏柘僮, 刘英, 杨明, 等. 应用 Box-Behnken 设计优化地榆皂苷的闪式提取工艺研究 [J]. 中草药, 2012, 43(3): 501-504.