

正交试验优化人参的微波灭菌工艺研究

吴建雄^{1,2,3}, 曹光环^{1,2,3}, 秦建平^{1,2,3}, 王振中^{1,2,3}, 朱跃飞⁴, 萧伟^{1,2,3*}

1. 江苏康缘药业股份有限公司, 江苏 连云港 222001
2. 中药制药过程新技术国家重点实验室, 江苏 连云港 222001
3. 江苏省企业院士工作站, 江苏 连云港 222001
4. 连云港康宝鹿业有限公司, 江苏 连云港 222000

摘要: 目的 优选人参药材微波灭菌工艺。方法 以灭菌率为指标, 采用正交试验对药材粒度、灭菌时间、灭菌功率进行考察, 并考察微波灭菌对人参皂苷的影响。结果 筛选出最佳微波灭菌工艺: 灭菌时间 240 s、人参药材粒度为细粉(10 目)、灭菌功率 6 000 W。结论 优选的工艺灭菌效率高, 简便可行。

关键词: 人参; 微波; 灭菌; 正交试验; 灭菌率

中图分类号: R282.4; R286.02 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2012)01-0027-04

Sterilization technology optimization of *Ginseng Radix et Rhizoma* with microwave by orthogonal test

WU Jian-xiong^{1,2,3}, CAO Guang-huan^{1,2,3}, QIN Jian-ping^{1,2,3}, WANG Zhen-zhong^{1,2,3}, ZHU Yue-fei⁴, XIAO Wei^{1,2,3}

1. Jiangsu Kanion Pharmaceutical Co., Ltd., Lianyungang 222001, China
2. State Key Laboratory of Pharmaceutical Process New-tech for Chinese Medicine, Lianyungang 222001, China
3. Enterprises Academician Workstations in Jiangsu Province, Lianyungang 222001, China
4. Lianyungang Kangbao Deer Industry Co., Ltd., Lianyungang 222000, China

Abstract: **Objective** To optimize the sterilization technology of *Ginseng Radix et Rhizoma* with microwave. **Methods** The sterilization rate was used as the index to evaluate the technologies based on orthogonal test, in which the powder particle size of *Ginseng Radix et Rhizoma*, sterilization time, and microwave power were considered as three main technology factors, and the contents of ginsenosides were observed. **Results** The optimum condition was as follows: sterilization time 240 s, the powder particle size 10 mesh, and microwave power 6 000 W. **Conclusion** The new sterilization procedure is efficient and easy to operate.

Key words: *Ginseng Radix et Rhizoma*; microwave; sterilization; orthogonal test; sterilization rate

人参是五加科人参属植物人参 *Panax ginseng* C. A. Meyer 的干燥根。在《神农本草经》中被列为上品, 是常用的滋补强壮药, 也是贵重药材, 其主要活性成分为人参皂苷^[1-4]。在中药制剂中人参常以药材细粉入药, 在入药前需经灭菌处理。中药防菌灭菌方法有热压及流通蒸汽灭菌法、干热灭菌法、环氧乙烷灭菌法等, 这些灭菌法用于中药材及固体制剂灭菌都或多或少地存在一些不足^[5-6]。近些年

来, 微波由于其穿透力强、选择性高、加热效率高等特点, 在中药及其制剂灭菌方面有一些应用和尝试^[7]。微波技术作为一种杀菌技术, 具有杀菌效率高、速度快、环保等优点^[8]。为寻求较理想的灭菌方法, 本实验将微波引入人参药材灭菌, 对人参微波灭菌工艺进行了研究。

1 仪器与材料

HWZ—10B—I 箱式微波真空干燥设备(天水

收稿日期: 2011-10-11

基金项目: 国家科技部“973”计划项目(2010CB735604)

作者简介: 吴建雄(1979—), 男, 湖北蕲春人, 工程师, 南京中医药大学中药学硕士研究生, 2003年毕业于湖北中医药大学制药工程专业, 主要从事中药新药研发工作, 先后主持过20多个项目的工艺和产业化研究工作, 对于中药的研发生产全过程控制、中药新技术和新工艺应用具有较为丰富的经验。Tel: (0518)85521933 E-mail: jxwu20@gmail.com

*通讯作者 萧伟(1959—), 男, 研究员级高级工程师, 博士, 主要从事中药制剂和创新中药的开发与研究。

华圆制药设备科技有限责任公司, 工作频率 2 450 MHz, 微波功率 10 kW); Agilent 1100 series 高效液相色谱仪; 30B 型万能粉碎机 (江苏瑰宝集团有限公司)。

营养琼脂培养基 (国药集团化学试剂有限公司, 批号 20110517); 人参购自康缘药业大药房, 经笔者鉴定为五加科植物人参 *Panax ginseng* C. A. Meyer 的干燥根; 人参皂苷 Rg₁ (批号 0703-200921)、人参皂苷 Re (批号为 110754-200918)、人参皂苷 Rb₁ (批号 110704-200918) 对照品均由中国药品生物制品检定所提供; 乙腈为色谱纯; 水为重蒸水, 其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 因素水平的确定

因素和水平的选择是建立在微波干燥灭菌的实践经验和前期预试验基础之上的, 选取灭菌功率 (A)、灭菌时间 (B) 和药材粒度 (C) 为考察因素, 每个因素设定 3 个水平, 因素水平见表 1。

2.2 试验设计与结果

取人参净药材分别粉碎成粗粉 (10 目)、细粉

(60 目)、细粉 (100 目)。取样, 进行细菌数的检测。按 L₉(3⁴) 正交表安排试验, 设置微波真空干燥箱温度 60 °C, 每份人参粉末为 1.0 kg, 分别用少量的水拌润, 以一定的厚度 (1~2 cm) 均匀平铺于微波真空干燥箱内部托盘上, 以预定的灭菌时间和灭菌功率对人参进行灭菌处理。灭菌结束后, 立即将经过灭菌处理的人参粉末装入事先已灭菌的容器, 按《中国药典》2010 年版一部附录 X III 微生物限度检查法, 对其进行细菌数的检测。结果见表 2, 方差分析见表 3。

灭菌率 = (灭菌前的细菌数 - 灭菌后的细菌数) / 灭菌前的细菌数 × 100%

表 1 因素水平

Table 1 Factors and levels

水平	因素		
	A /W	B /s	C /目
1	2 000	120	10
2	4 000	180	60
3	6 000	240	100

表 2 L₉(3⁴) 正交试验设计及结果

Table 2 Design and results of L₉(3⁴) orthogonal test

试验号	A	B	C	D (空白)	灭菌率/%
1	1	1	1	1	69.78
2	1	2	2	2	76.20
3	1	3	3	3	87.25
4	2	1	2	3	85.43
5	2	2	3	1	98.04
6	2	3	1	2	99.90
7	3	1	3	2	92.42
8	3	2	1	3	99.60
9	3	3	2	1	99.58
K ₁	233.23	247.63	269.28	267.40	
K ₂	283.37	273.84	261.21	268.52	
K ₃	291.60	286.73	277.71	272.28	
R	19.73	13.03	5.50	1.63	

表 3 方差分析

Table 3 Analysis of variance

因 素	离均差平方和	自由度	均 方	F 值	显著性
A	665.42	2	332.71	152.75	P<0.01
B	264.66	2	132.33	60.75	P<0.05
C	45.38	2	22.69	10.42	
空白 (误差)	4.36	2	2.18	1.00	

F_{0.05}(2,2)=19.00 F_{0.01}(2,2)=99.00

直观分析表明, 在所选因素水平范围内, 影响因素 $A>B>C$; 方差分析表明只有灭菌功率有极显著性影响, 灭菌时间具有显著影响, 人参药材粉碎粒度无影响。因此优选的人参微波灭菌工艺为 $A_3B_3C_1$, 即灭菌功率为 6 000 W, 灭菌时间为 240 s, 药材粒度为粗粉 (10 目)。

2.3 工艺验证

按优选工艺平行制备 3 份样品, 设置微波真空干燥箱温度 60 ℃, 将人参粗粉 (10 目) 用少量的水拌润, 以一定的厚度 (1~2 cm) 均匀平铺于微波真空干燥箱内部托盘上, 灭菌时间为 240 s, 灭菌功率为 6 000 W, 对其进行灭菌处理。测定灭菌前后人参药材粉的细菌数, 结果见表 4。可见灭菌率均处于较高水平, 表明该工艺合理可行, 具可操作性 and 重复性。

表 4 验证试验 ($n=3$)
Table 4 Verification test ($n=3$)

序 号	灭菌率/%
1	98.62
2	99.26
3	99.54

2.4 微波处理对人参皂苷的影响

2.4.1 色谱条件与系统适用性试验^[9] Kromasil 100-5 C_{18} (250 mm×4.6 mm, 5 μ m) 色谱柱; 以乙腈-水为流动相, 进行梯度洗脱; 检测波长为 203 nm。理论板数按人参皂苷 R_{g1} 峰计算不低于 6 000。色谱图见图 1。

2.4.2 对照品溶液的制备 精密称取人参皂苷 R_{g1} 对照品、人参皂苷 R_e 对照品及人参皂苷 R_{b1} 对照品适量, 加甲醇制成各含 0.2 mg/mL 的混合溶液, 摇匀, 即得。

2.4.3 供试品溶液的制备 取供试品粉末 (过四号筛) 约 1 g, 精密称定, 置索氏提取器中, 加三氯甲

烷加热回流 3 h, 弃去三氯甲烷液, 药渣挥干溶剂, 连同滤纸筒移入 100 mL 锥形瓶中, 精密加水饱和和正丁醇 50 mL, 密塞, 放置过夜, 超声处理 (功率 250 W, 频率 50 kHz) 30 min, 滤过, 弃去初滤液, 精密量取续滤液 25 mL, 置蒸发皿中蒸干, 残渣加甲醇溶解并转移至 5 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.4.4 测定法 分别精密吸取人参皂苷 R_{g1} 、人参皂苷 R_e 及人参皂苷 R_{b1} 混合对照品溶液和人参供试品溶液各 10 μ L, 注入液相色谱仪, 测定, 计算, 即得, 结果见表 5。对人参进行不同功率的微波处理, 测定处理前后人参皂苷的变化, 通过单因素方差分析表明, 灭菌前后的人参皂苷 R_e 、 R_{b1} 、 R_{g1} 的质量分数无明显变化。

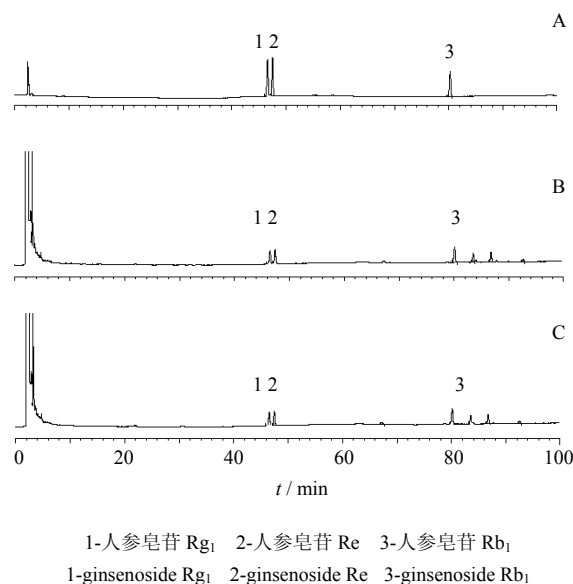


图 1 对照品 (A)、灭菌前人参样品 (B) 和灭菌后人参样品 (C) 的 HPLC 图

Fig.1 HPLC Chromatograms of reference substance (A), *Ginseng Radix et Rhizoma* before (B) and after (C) sterilizing

表 5 不同功率微波处理人参的人参皂苷变化 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)
Table 5 Change of ginsenosides with different microwave power ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

处理功率/W	人参皂苷 $R_{g1}/(\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1})$	人参皂苷 $R_e/(\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1})$	人参皂苷 $R_{b1}/(\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1})$
0	$1\,916.174 \pm 421.252$	$1\,911.258 \pm 658.423$	$2\,625.134 \pm 867.362$
2 000	$1\,862.314 \pm 605.435$	$1\,857.432 \pm 742.254$	$2\,548.726 \pm 568.396$
4 000	$1\,871.223 \pm 536.542$	$1\,867.401 \pm 539.428$	$2\,467.356 \pm 789.358$
6 000	$1\,860.975 \pm 489.568$	$1\,856.623 \pm 642.612$	$2\,453.697 \pm 654.486$

3 讨论

本品采用微波真空干燥设备对人参进行灭菌, 灭菌效果好, 时间短^[10], 保持了原药材的成分。微波是一种超高频电磁波, 具有很强的穿透作用, 可以在药材颗粒内外同时均匀、迅速地加热。它可使具有永久偶极的分子产生高达 4.9×10^9 次/s 的共振频率, 使分子平均动能迅速增加^[11]。微波灭菌的原理是两方面的, 它既有热效应灭菌, 又有非热效应灭菌, 因此具有双重杀菌功能。微波加热时, 细菌体内的蛋白质、核酸成分等分子极性基团在微波场下高速旋转、振动, 一方面加热使细菌蛋白质凝固而死亡; 另一方面也可以使蛋白质、核酸变性而死亡。利用脉冲调制的微波能进行杀菌试验, 可以用较小的温升达到杀菌的目的。这说明微波杀菌不只是热力杀菌, 还有非热力致死细菌的能力, 这就是所谓的非热效应。根据这个原理, 可以在极短的时间内采用高于常规微波场能量密度的数倍或数十倍的脉冲微波能量, 不但可以可靠杀死细菌, 还可大大降低药品温升, 降低设备的能耗。水是吸收微波很好的介质, 因此本实验中在人参粉末中加入少量的水拌润, 可以增强灭菌效果。

通过实验确定的最佳微波灭菌工艺参数为: 灭菌功率 6 000 W、灭菌时间 240 s、药材粒度粗粉(10 目)。在该微波灭菌工艺条件下, 灭菌前后的人参中人参皂苷 Re、Rb₁、Rg₁ 的量无明显变化, 灭菌处理后细菌总数小于 500 个/g, 关于微波对霉菌、大

肠菌群等微生物指标的影响有待于进一步研究。

参考文献

- [1] 张 萍, 王金东, 肖新月, 等. 人参化学成分分析方法的研究进展 [J]. 中草药, 2004, 35(12): 1429-1432.
- [2] 吕梦捷, 曾耀英, 宋 兵. 人参皂苷 Rb₁ 对小鼠 T 淋巴细胞体外活化、增殖及凋亡的影响 [J]. 中草药, 2011, 42(4): 743-748.
- [3] 徐 静, 贾 力, 赵余庆. 人参的化学成分与人参产品的质量评价 [J]. 药物评价研究, 2011, 34(3): 199-203.
- [4] 王立成, 周兴军. 药物灭菌技术及其对中药的影响 [J]. 实用药物与临床, 2008, 11(6): 375-376.
- [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): 204-207.
- [6] 王丽萍. 目前中药制剂主要灭菌方法及其存在问题 [C]. //2009 年全国中药学术研讨会论文集. 贵阳: 中国中西医结合学会, 2009: 92-94.
- [7] 孙怀远. 微波干燥与微波灭菌技术在中药生产中的应用 [J]. 中成药, 2004, 26(8): 667-668.
- [8] England J M, Rowan R M, van Assendelft O W, *et al.* Guidelines for the evaluation of blood cell analysers including those used for differential leucocyte and reticulocyte counting and cell marker applications [J]. *Clin Lab Haemat*, 1994, 16(2): 157-174.
- [9] 中国药典 [S]. 一部. 2010: 8.
- [10] 陈金传. 微波能在医药工业中的应用 [J]. 中草药, 2001, 32(9): 附 1-2.
- [11] 曾昭钧, 李香文. 微波有机化学进展 [J]. 沈阳药科大学学报, 1999, 16(4): 304-309.