

## 覆盆子生药粉湿热灭菌工艺优化及不同灭菌方式对质量影响研究

崔琳琳<sup>1</sup>, 冯巧巧<sup>2\*</sup>, 曹玲<sup>1</sup>, 高艳红<sup>1</sup>

1. 鲁南制药集团股份有限公司 中药制药共性技术国家重点实验室, 山东 临沂 276006

2. 山东省食品药品审评查验中心, 山东 济南 250107

**摘要:** 目的 通过多指标正交试验优选覆盆子生药粉最佳湿热灭菌工艺, 对比不同灭菌方式对覆盆子生药粉的灭菌效果及质量的影响。方法 以山柰酚3-O-芸香糖苷、鞣花酸的含量和灭菌率的综合评分为指标, 采用层次分析(AHP)法、指标重复性相关(CRITIC)法和AHP-CRITIC混合加权法确定各指标权重系数, 结合正交试验筛选覆盆子湿热灭菌工艺中灭菌时间、灭菌温度和物料厚度, 优化覆盆子灭菌工艺参数; 通过微生物限度检测, 生药粉鞣树苷鉴别, 水分、总灰分、酸不溶灰分、浸出物、山柰酚3-O-芸香糖苷和鞣花酸含量检测, 指纹图谱检测, 对比采用湿热灭菌、辐照灭菌、干热灭菌和乙醇灭菌法对覆盆子生药粉灭菌效果和质量的影响。结果 AHP-CRITIC混合加权法较AHP法和CRITIC法更为科学、合理, 按照其确定的权重系数进行综合评价确定的覆盆子最佳湿热灭菌工艺条件为灭菌时间15 min、灭菌温度115 °C、物料厚度5 mm; 各灭菌样品的微生物限度检查等均符合药典规定, 与未灭菌生药粉相比, 山柰酚3-O-芸香糖苷经乙醇灭菌与干热灭菌后含量降低, 鞣花酸经干热灭菌后含量增加; 指纹图谱结果显示, 干热灭菌与未灭菌相比相似度较低, 辐照灭菌、湿热灭菌与未灭菌相比相似度较高。结论 湿热灭菌法与其他灭菌方法相比, 可在较低温度、更短时间得到符合规定的覆盆子生药粉, 且优选得到的灭菌工艺稳定可行、重复性好。

**关键词:** 覆盆子; 正交试验; 湿热灭菌; 干热灭菌; 乙醇灭菌; 辐照灭菌; 山柰酚3-O-芸香糖苷; 鞣花酸

中图分类号: R282.4 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2022)05-0918-08

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2022.05.014

## Optimization of moist heat sterilization technology for *Rubus chingii* and quality impact research for different sterilization methods

CUI Linlin<sup>1</sup>, FENG Qiaojiao<sup>2</sup>, CAO Ling<sup>1</sup>, GAO Yanhong<sup>1</sup>

1. State Key Laboratory of Generic Manufacture Technology of Traditional Chinese Medicine of Lunan Pharmaceutical Group Co., Ltd., Linyi 276006, China

2. Shandong Center for Food and Drug Evaluation & Inspection, Jinan 250107, China

**Abstract: Objective** To optimize the sterilization process of crude drug power of *Rubus chingii* through multi-index orthogonal experiment, compare the effect of different sterilization methods on the sterilization effect and quality of crude drug power of *Rubus chingii*. **Methods** With the content of kaempferol 3-O-rutinoside, ellagic acid and the sterilization rate as comprehensive evaluation indexes, weight coefficient of indicators were determined by AHP, CRITIC and AHP-CRITIC mixed weighting method,  $L_9(3^4)$  orthogonal test was used to sterilization time, sterilization temperature and material thickness, in sterilization process of *Rubus chingii*, optimizing process parameters of sterilization. The sterilization effect and quality of crude drug power of *Rubus chingii* before and after sterilization were compared by moist heat sterilization, irradiation sterilization, dry heat sterilization and ethanol sterilization. **Results** The weight coefficient determined by AHP-CRITIC mixed weighting method was the most reasonable. The optimal extraction technology was sterilization time 30 min, sterilization temperature 115 °C and material thickness 5 mm. The microbial limit inspection of each sterilized sample complies with the pharmacopoeia regulations. Compared with the unsterilized crude drug powder, the content of kaempferol 3-O-rutinoside was reduced after ethanol sterilization and dry heat sterilization. The

收稿日期: 2021-09-13

基金项目: 国家重点研发计划-中药口服制剂先进制造关键技术与示范研究(2019YFC1711200); 山东省重点研发计划(重大科技创新工程)(2020CXGC010505)

第一作者: 崔琳琳(1994—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药制剂研究与工艺优化。Tel: 15941159162 E-mail: linlinc199412@163.com

\*通信作者: 冯巧巧(1977—), 女, 副主任药师, 研究方向为新药开发、技术审评与注册核查。Tel: (0531)88592873 E-mail: fqqangel@126.com

content increased after sterilization. The fingerprint results showed that the similarity of dry heat sterilization was lower than that of non-sterilized, and the similarity of radiation sterilization and moist heat sterilization was higher than that of non-sterilized.

**Conclusion** Compared with other sterilization methods, the moist heat sterilization method can obtain the crude drug power of *Rubus chingii* that meets the requirements at a lower temperature and in a shorter time. The preferably obtained sterilization process is stable, feasible, and reproducible.

**Key words:** *Rubus chingii*; orthogonal design; moist heat sterilization; dry heat sterilization; ethanol sterilization; radiation sterilization; kaempferol 3-*O*-rutinoside; ellagic acid

参芪降糖颗粒(Shenqi Jiangtang Granules, SJG)是由人参(茎叶)皂苷、覆盆子、黄芪、五味子、山药、地黄、麦冬、茯苓、天花粉、泽泻、枸杞子11味中药组成的中药复方制剂,具有益气养阴、滋脾补肾之功效,临床上主要用于气阴两虚、2型糖尿病及并发症的治疗,效果良好<sup>[1-2]</sup>。原方中覆盆子、茯苓、天花粉、山药需要直接打粉入药,药材打粉入药往往携带大量的微生物<sup>[3]</sup>,因此中药生药粉入药前需要进行灭菌处理,使其微生物含量在《中国药典》的限定范围之内。目前实际生产采用的灭菌方式有辐射灭菌、乙醇蒸汽灭菌等<sup>[4]</sup>,这些方法均存在不同程度的缺点和问题,或破坏药物的有效成分,影响疗效;或有辐射、有机溶剂残留;或能耗大、时间长,影响经济效益。因此药物灭菌时必须结合药物的性质、有效成分特点等综合选择有效的灭菌方法<sup>[3,5]</sup>。

覆盆子为蔷薇科植物华东覆盆子 *Rubus chingii* Hu 的干燥果实,性甘、酸,温,归肝、肾膀胱经,具有益肾固精缩尿,养肝明目的药理作用。临床用于治疗遗精滑精、遗尿尿频、阳痿早泄、目暗昏花等病症。现代药理研究表明,覆盆子含有黄酮类、萜类、生物碱等多种活性成分,具有抗肿瘤、抗衰老、抗炎等药理作用<sup>[6-7]</sup>,中药材的活性成分是保证药品安全有效的指标,因此,在对中药材生药粉进行灭菌后,不仅要考虑灭菌率,更应该在保证灭菌效果的同时尽可能地保留有效成分不被破坏<sup>[3]</sup>。目前实际生产采用的灭菌方式为辐照灭菌,虽然辐照灭菌效果理想,但辐照灭菌辐照剂量超标对身体产生的安全性问题一直存在争议,消费者对经过辐照灭菌的产品存有安全疑虑<sup>[8-9]</sup>。湿热灭菌法是利用流通蒸气或高压饱和蒸气等手段使微生物菌体中的蛋白质、核酸发生变性而杀灭微生物<sup>[10]</sup>,对热不敏感,不含挥发性成分的中药材灭菌具有灭菌能力强、简便易行、成本低等优势。目前对于覆盆子灭菌工艺的研究不多,故本研究以覆盆子生药粉为研究对象,以山柰酚 3-*O*-芸香糖苷、鞣花酸的含量以及灭菌率作为评价指标,采用多指标权重分析法结合正交试验优选覆盆子湿热灭菌工艺,同时与常规灭菌方法进

行对比研究,对湿热灭菌技术的优势进行探讨,为后续开发以及制剂研究提供依据。

## 1 材料

脉动真空灭菌柜,张家港市环宇制药设备有限公司;Waterse2695型高效液相色谱仪,美国 Waters 公司;XS105DU型电子天平,北京赛多利斯科学仪器有限公司;GZX-9240MBE型电热鼓风干燥箱,上海博讯实业有限公司医疗设备厂。

覆盆子(批号200910),购自安徽中药饮片有限公司,经辽宁中医药大学翟延君教授鉴定为蔷薇科植物华东覆盆子 *Rubus chingii* Hu 的干燥果实;山柰酚 3-*O*-芸香糖苷(批号112007-201602,质量分数90.8%)、鞣花酸(批号111959-201903,质量分数88.8%)均购自中国食品药品检定研究院。甲醇(批号20105219)、乙腈(批号20045077),购自美国天地有限公司;磷酸(批号191115647F)、乙醇(批号200211160H),购自南京化学试剂有限公司,水为纯化水。

## 2 方法与结果

### 2.1 覆盆子生药粉灭菌方法

**2.1.1 覆盆子生药粉制备** 取覆盆子药材,粉碎过六号筛,备用。

**2.1.2 灭菌样品的制备** 分别用湿热灭菌、辐照灭菌、干热灭菌、乙醇灭菌<sup>[11]</sup>方法制备覆盆子生药粉的灭菌样品。湿热灭菌:脉动真空灭菌柜 121 °C 灭菌 15 min;干热灭菌:烘箱 160~170 °C 灭菌 150 min;辐照灭菌:<sup>60</sup>Co 射线 6 kGy 辐照灭菌;乙醇灭菌:75%乙醇浸润、密闭 12~36 h。

### 2.2 含量测定

**2.2.1 色谱条件** 参照《中国药典》2020年版覆盆子“含量测定”项下内容<sup>[12]</sup>。色谱柱:SepaxBio-C<sub>18</sub>(150 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈-0.2%磷酸溶液(15:85);体积流量 1.0 mL·min<sup>-1</sup>;柱温 30 °C;进样量 10 μL;检测波长:山柰酚 3-*O*-芸香糖苷 344 nm,鞣花酸 254 nm。

**2.2.2 对照品溶液的制备** 精密称取山柰酚 3-*O*-芸香糖苷、鞣花酸对照品适量,精密称定,加甲醇制

成80.5、5.3  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的对照品溶液。

**2.2.3 供试品溶液的制备** 参照《中国药典》2020年版覆盆子含量测定项下制备山柰酚3-*O*-芸香糖苷、鞣花酸供试品溶液。

**2.2.4 线性关系考察** 取“2.2.2”项下山柰酚3-*O*-芸香糖苷和鞣花酸对照品溶液1、2、5、10、15、20  $\mu\text{L}$ 注入液相色谱仪,按“2.2.1”项下色谱条件进样测定,以峰面积为纵坐标、进样量( $\mu\text{g}$ )为横坐标绘制标准曲线,得到山柰酚3-*O*-芸香糖苷回归方程为 $y=162\,028x+1\,693.3$ ( $r=0.999\,1$ ),鞣花酸回归方程为 $y=192\,922x+73.881$ ( $r=0.999\,6$ ),结果表明,山柰酚3-*O*-芸香糖苷在0.080 5~1.610 8  $\mu\text{g}$ 内线性关系良好,鞣花酸在0.005 3~0.106 0  $\mu\text{g}$ 内线性关系良好。

**2.2.5 精密度试验** 取“2.2.2”项下对照品溶液适量,按“2.2.1”项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果显示,山柰酚3-*O*-芸香糖苷峰面积的RSD为1.57%,鞣花酸峰面积的RSD为1.23%( $n=6$ ),表明仪器精密度良好。

**2.2.6 稳定性试验** 按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,分别于室温下放置0、2、4、8、12、24 h后按“2.2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,山柰酚3-*O*-芸香糖苷峰面积的RSD为1.41%,鞣花酸峰面积的RSD为1.49%( $n=6$ ),表明供试品溶液在室温下放置24 h内稳定。

**2.2.7 重复性试验** 精密称取6份覆盆子粉末,按“2.2.3”项下方法制备成供试品溶液,再按“2.2.1”项下色谱条件进样分析,所得供试品溶液中山柰酚3-*O*-芸香糖苷的平均质量分数为0.176 2  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ,RSD为1.95%;鞣花酸的平均质量分数为2.0147  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ,RSD为1.95%( $n=6$ ),表明该方法重复性良好。

**2.2.8 加样回收率试验** 精密称取已知含量的覆盆子供试品0.5 g(6份),分别精密加入对照品溶液,按“2.2.3”项下方法制备成供试品溶液。按“2.2.1”项下色谱条件进样分析,记录峰面积,并计算样品溶液中山柰酚3-*O*-芸香糖苷和鞣花酸含量。山柰酚3-*O*-芸香糖苷的平均回收率为98.71%,RSD为1.11%;鞣花酸的平均回收率为100.14%,RSD为1.54%( $n=6$ ),表明该方法准确度良好。

## 2.3 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》2020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<sup>[13]</sup>。

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

## 2.4 正交试验优选灭菌工艺

根据相关文献方法<sup>[14]</sup>及实验室常规灭菌参数,以灭菌时间(A)、灭菌温度(B)、物料厚度(C)为考察因素,以覆盆子中山柰酚3-*O*-芸香糖苷、鞣花酸含量及灭菌率为考察指标设计 $L_9(3^4)$ 正交试验。因素与水平见表1。

表1 因素与水平

Table 1 Factors and levels

水平	因素		
	灭菌时间/min	灭菌温度/ $^{\circ}\text{C}$	物料厚度/mm
1	15	105	5
2	20	115	10
3	30	121	15

## 2.5 指标权重系数的确定

**2.5.1 层次分析(AHP)法确定权重系数** 根据覆盆子药典指标成分药理作用的强弱,对山柰酚3-*O*-芸香糖苷和鞣花酸的含量、灭菌率作出权重指标予以量化。将3个指标分为3个层次,确定3项指标的优先顺序为:山柰酚3-*O*-芸香糖苷>鞣花酸>灭菌率。构建的指标成对比较的判断优先矩阵见表2。根据表2评分结果,AHP法计算得到山柰酚3-*O*-芸香糖苷、鞣花酸、灭菌率的权重系数分别为0.633 3、0.260 5、0.106 2,一致性比例因子(CR)=0.037 2<0.1,指标优先比较判断矩阵具有满意的一致性,权重系数有效。

表2 指标成对比较的优先矩阵

Table 2 Priority matrix for pairwise comparison of indicators

权重指标	山柰酚3- <i>O</i> -芸香糖苷	鞣花酸	灭菌率
山柰酚3- <i>O</i> -芸香糖苷	1	3	5
鞣花酸	1/3	1	3
灭菌率	1/5	1/3	1

**2.5.2 CRITIC法确定权重系数** CRITIC法以评价指标间的对比强度及冲突性作为基础,通过计算标准差将对对比强度体现出来,是一种能客观反映各评价指标权重的计算方法<sup>[15]</sup>,故采用CRITIC法确定各指标权重系数。将正交试验结果数据作线性差值处理,即[指标成分值=(实测值-最小值)/(最大

值-最小值)×100],消除单位量纲后,利用SPSS 22.0软件计算指标间的对比强度(S<sub>i</sub>)、冲突性(δ<sub>i</sub>)、综合权重(c<sub>i</sub>)与权重(ω<sub>i</sub>),结果见表3,计算得到山柰酚3-O-芸香糖苷、鞣花酸含量和灭菌率3个指标的权重系数分别为0.434 6、0.296 7、0.268 7。

表3 CRITIC法相关计算数据

指标	山柰酚3-O-芸香糖苷	鞣花酸	灭菌率
S <sub>i</sub>	32.551	33.407	36.929
δ <sub>i</sub>	3.051	2.030	1.663
c <sub>i</sub>	99.302	67.807	61.394
ω <sub>i</sub>	0.434 6	0.296 7	0.268 7

**2.5.3 AHP-CRITIC法混合加权法** AHP-CRITIC混合加权法兼具AHP法和CRITIC法两者优点,能全面客观体现样本的数据信息,ω<sub>综合ij</sub>=ω<sub>AHPij</sub>×ω<sub>CRITICij</sub>/∑(ω<sub>AHPij</sub>×ω<sub>CRITICij</sub>)(ω<sub>AHPij</sub>表示AHP法计算的权重系数,ω<sub>CRITICij</sub>表示CRITIC法计算的权重系数,i表示第i个因素,j表示第j个样本)。根据AHP-CRITIC混合加权法计算得山柰酚3-O-芸香糖苷、鞣花酸含量和灭菌率的权重系数分别为0.722 3、0.202 8、0.074 9。

分别用3种赋权法得到的权重系数对正交试验数据进行综合评分,结果见表4。

结果显示,3种赋权法得到的综合评分结果差异较小,通过SPSS 22.0软件对3种赋权法得到的综合评分进行相关性分析,结果AHP法与CRITIC法得到的综合评分之间的相关系数为0.847,AHP法与AHP-CRITIC混合加权法得到的综合评分之间的相关系数为0.974,CRITIC法与AHP-CRITIC混合加权法得到的综合评分之间的相关系数为0.704,三者之间的相关性均显著(P<0.05),说明这3种赋权

表4 3种赋权法的综合评分结果

Table 4 Comprehensive scoring results of three kinds of weighting methods

组号	AHP法	CRITIC法	AHP-CRITIC混合加权法
1	91.83	90.27	93.66
2	79.37	81.95	79.02
3	83.17	83.01	84.54
4	83.93	83.10	85.94
5	86.75	86.34	88.33
6	85.62	87.47	85.29
7	92.99	93.59	93.18
8	78.64	85.34	75.64
9	81.29	85.91	79.64

法得到的评分结果具有一致性。对AHP法与CRITIC法权重系数进行相关性分析,结果显示两者权重系数的相关系数的P值为0.083>0.05,相关性不显著。相比之下,AHP-CRITIC混合加权法从主客观2个方面加以考虑,所体现的信息量更加全面,因此选用AHP-CRITIC混合加权法确定权重系数进行综合评分计算。

综合评分=[(山柰酚3-O-芸香糖苷含量/山柰酚3-O-芸香糖苷含量最大值)×0.722 3+(鞣花酸含量/鞣花酸含量最大值)×0.202 8+(灭菌率/灭菌率最大值)×0.074 9]×100

**2.6 最佳湿热灭菌工艺的确定及验证试验**

**2.6.1 正交试验结果分析** 利用SPSS 22.0软件对正交试验结果进行分析,直观分析结果见表5,方差分析结果见表6。

由直观分析结果可知,各因素对覆盆子灭菌工艺作用的主次为物料厚度(C)>灭菌时间(A)>灭菌温度(B)。方差分析结果表明,灭菌时间(A)和物料厚度(C)对试验结果具有显著性影响(P<0.05),

表5 直观分析结果

Table 5 Visually analyze results

组号	A	B	C	D	质量分数/(mg·g <sup>-1</sup> )		灭菌率/%	综合评分
					山柰酚3-O-芸香糖苷	鞣花酸		
1	60	115	5	1	0.198	2.223	96.32	93.66
2	60	121	10	2	0.155	2.401	94.16	79.02
3	30	121	5	3	0.177	2.012	93.57	84.54
4	15	121	15	1	0.184	1.804	95.29	85.94
5	15	115	10	2	0.186	2.053	97.23	88.33
6	60	105	15	3	0.167	2.679	95.12	85.29
7	15	105	5	1	0.186	2.801	98.23	93.18
8	30	105	10	2	0.131	3.184	99.16	75.64
9	30	115	15	3	0.148	2.856	98.96	79.64
K <sub>1</sub>	89.150	84.703	90.460	89.947				
K <sub>2</sub>	79.940	87.210	80.997	86.053				
K <sub>3</sub>	85.990	83.167	83.623	85.080				
R	9.210	4.043	9.463	2.106				

表6 方差分析结果  
Table 6 Variance analysis results

方差来源	离差平方和	自由度	F值	显著性
A	131.412	2	19.702	$P < 0.05$
B	24.993	2	3.747	$P > 0.05$
C	143.194	2	21.469	$P < 0.05$
误差	6.670	2		
$F_{0.05}(2,2) = 19.00$				

最终优选的结果为A<sub>1</sub>B<sub>2</sub>C<sub>1</sub>,即灭菌时间15 min、灭菌温度115 °C、物料厚度5 mm。

**2.6.2 验证试验** 精密称取覆盆子药材3份,按最佳工艺A<sub>1</sub>B<sub>2</sub>C<sub>1</sub>条件进行灭菌,测定山柰酚3-O-芸香糖苷、鞣花酸含量,测定计算灭菌率,结果见表7。

3次验证试验山柰酚3-O-芸香糖苷平均质量分数为0.204 2 mg·g<sup>-1</sup>、鞣花酸平均质量分数为3.110 7 mg·g<sup>-1</sup>、灭菌率平均值为99.32%,平均综合评分为98.66(RSD=1.17%),表明该工艺稳定、可行、重复性好,可作为覆盆子灭菌工艺。

## 2.7 湿热灭菌法与其他灭菌方式的对比

**2.7.1 微生物限度对比** 按《中国药典》2020年版四部通则1108中药饮片微生物限度检查法进行实验,结果见表8,各灭菌样品均达到预期灭菌效果。

**2.7.2 《中国药典》各项检查结果对比** 按《中国药典》2020年版一部覆盆子项下各项检查要求,对灭菌前后覆盆子生药粉椴树苷鉴别、水分、总灰分、酸

表7 平行验证试验结果(n=3)  
Table 7 Parallel verification test (n=3)

试验号	质量分数/(mg·g <sup>-1</sup> )		灭菌率/%	综合评分
	山柰酚3-O-芸香糖苷	鞣花酸		
1	0.202	3.059	99.62	98.17
2	0.200	3.126	99.10	97.83
3	0.206	3.146	99.23	99.97
RSD/%	1.42	1.47	0.27	1.17

表9 不同灭菌方法药典项检测结果

Table 9 Test results of pharmacopoeial items of different sterilization methods

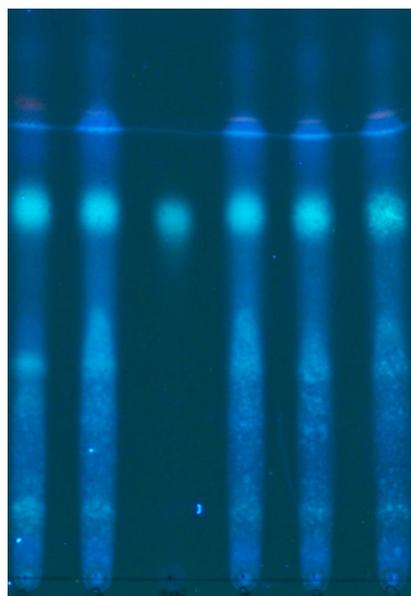
灭菌参数	椴树苷鉴别	水分/%	水溶性浸出物/%	总灰分/%	酸不溶性灰分/%	鞣花酸/%	山柰酚3-O-芸香糖苷/%	结果
未灭菌	检出	8.36	23.85	3.79	0.01	4.289	0.247	合格
湿热灭菌	检出	2.14	24.32	4.18	0.02	4.156	0.236	合格
辐照灭菌	检出	2.48	24.44	4.19	0.09	4.234	0.235	合格
乙醇灭菌	检出	2.71	23.74	4.02	0.09	4.125	0.177	合格
干热灭菌	检出	3.36	26.60	4.55	0.16	6.525	0.104	合格
标准	检出	<12.0	>9.0	<9.0	<2.0	>0.2	>0.03	合格

表8 不同灭菌方覆盆子生药粉微生物限度检查结果  
Table 8 Test results of microbial limits of different sterilized recipes of crude drug power of *Rubus chingii*

灭菌方法	需氧菌总数/(CFU·g <sup>-1</sup> )	霉菌和酵母菌总数/(CFU·g <sup>-1</sup> )	大肠埃希菌	活螨
湿热灭菌	<10	<10	未检出	未检出
辐照灭菌	<10	<10	未检出	未检出
乙醇灭菌	<10	<10	未检出	未检出
干热灭菌	<10	<10	未检出	未检出

不溶灰分、浸出物、山柰酚3-O-芸香糖苷和鞣花酸含量测定进行检测,结果见图1和表9,各项检测结果均符合药典规定。但是乙醇灭菌和干热灭菌后山柰酚3-O-芸香糖苷与鞣花酸含量发生改变,其中山柰酚3-O-芸香糖苷含量降低,鞣花酸经过干热灭菌后含量增加。

**2.7.3 指纹图谱对比** 指纹图谱参照文献报道<sup>[16]</sup>



未灭菌 湿热 椴树苷 辐照 乙醇 干热  
灭菌 灭菌 对照品 灭菌 灭菌 灭菌

图1 不同灭菌方式椴树苷薄层鉴别

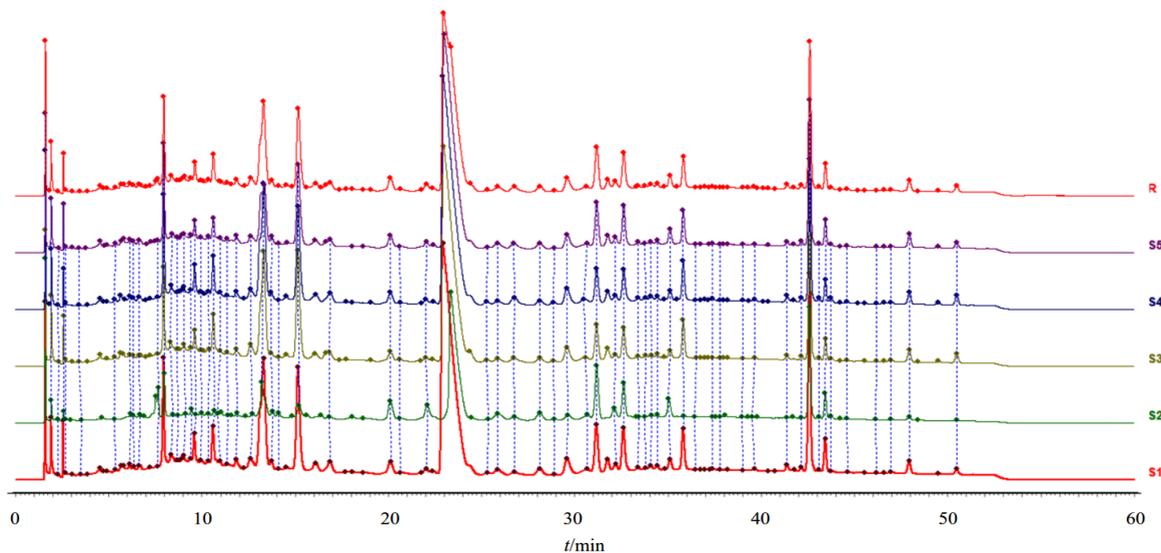
Fig. 1 Different methods of sterilization tilia glycoside thin-layer identification map

并根据实际检测条件进行优化。精密称取各样品，加入70%甲醇超声30 min，滤过，取续滤液。以SepaxBio-C<sub>18</sub>(150 mm×4.6 mm, 5 μm)色谱柱, 0.2%磷酸溶液(A)-乙腈(B)为流动相梯度洗脱, 洗脱条件为0~5 min, 10%~20%B; 5~20 min, 20%~40%B; 20~53 min, 40%~60%B。结果见图2, 相似度结果见表10。乙醇灭菌与未灭菌相比相似度较低, 辐照灭菌与湿热灭菌与未灭菌相比相似度较高。

### 3 讨论

中药生药粉主要是由中药饮片打粉制备而成, 其成分复杂, 是中药制剂重要的中间体。由于药材种植、生长、采收、加工的特殊性, 入药前虽经筛选、晒干、简单炮制等处理过程, 大多数的中药原料药都不同程度地带有一些细菌、霉菌或其他致病菌<sup>[17]</sup>, 为此, 中药生药粉的灭菌是中成药生产过程中不可或缺的一个环节。本研究通过对未灭菌及4

种灭菌方法的覆盆子生药粉样品进行检测, 结果显示4种灭菌方法微生物限度检查以及水分、总灰分等检测均符合药典标准规定, 干热灭菌法较灭菌前相比山柰酚3-O-芸香糖苷含量降低, 鞣花酸含量增加, 指纹图谱相似度仅为0.526, 推测干热灭菌长时间高温使山柰酚3-O-芸香糖苷糖苷键断裂, 导致含量降低, 鞣花酸含量的增高推测存在鞣花鞣质向鞣花酸的转化, 具体原因需要进一步验证<sup>[18-19]</sup>。乙醇灭菌法较灭菌前相比山柰酚3-O-芸香糖苷含量降低, 指纹图谱相似度较低, 推测乙醇对覆盆子存在影响。辐照灭菌与湿热灭菌与灭菌前相比指纹图谱相似度较高, 山柰酚3-O-芸香糖苷与鞣花酸含量未发生变化, 但是辐照灭菌存在残留问题且生产成本较高, 而湿热灭菌法在较短时间内就能把微生物杀灭, 且对覆盆子质量没有影响, 具有灭菌效果可靠、工艺设备简单、操作方便、生产成本较低等优势, 在实际大生产中是一种常用、经济的灭菌手段,



S1-干热灭菌; S2-乙醇灭菌; S3-辐照灭菌; S4-湿热灭菌; S5-未灭菌; R-对照图谱

S1-Dry heat sterilization; S2-Ethanol sterilization; S3-Irradiation sterilization; S4-Moist heat sterilization; S5-Not sterilized; R-control fingerprint

图2 不同灭菌方法样品指纹图谱

Fig. 2 Fingerprints of samples sterilized by different sterilization methods

表10 不同灭菌方法样品指纹图谱相似度

Table 10 Similarity of fingerprints of samples sterilized by different sterilization methods

灭菌方法	干热灭菌	乙醇灭菌	辐照灭菌	湿热灭菌	未灭菌	对照指纹图谱
干热灭菌	1.000	0.616	0.712	0.521	0.526	0.418
乙醇灭菌	0.616	1.000	0.898	0.891	0.898	0.893
辐照灭菌	0.712	0.898	1.000	0.993	0.998	0.993
湿热灭菌	0.521	0.891	0.993	1.000	0.993	0.996
未灭菌	0.526	0.898	0.998	0.993	1.000	0.995
对照指纹图谱	0.418	0.893	0.993	0.996	0.995	1.000

可以作为覆盆子生药粉的灭菌方法。

中药材成分相对比较复杂,若以单一指标进行工艺筛选,不能保证中药的整体质量,因此多指标综合评价已经成为现代研究中药的重要方法之一<sup>[20]</sup>,AHP-CRITIC混合加权法融合主观和客观2种方法的优点,比单一赋权法更科学,合理性更强,本研究采用AHP-CRITIC混合加权法结合正交试验优选覆盆子灭菌工艺,确定最佳灭菌工艺条件为灭菌时间30 min、灭菌温度115℃、物料厚度5 mm,灭菌效率达99.32%。

本研究通过比较4种不同的灭菌方法确定了覆盆子生药粉的灭菌方法,采用AHP-CRITIC混合加权法确定的多指标权重系数客观、真实,优选的灭菌工艺稳定且重复性好,可为覆盆子的后续工艺开发和工业化生产提供科学、可靠的依据。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] 赵能江,杨叔禹,李博. 参芪降糖颗粒治疗2型糖尿病临床应用专家共识 [J]. 中草药, 2020, 51(17): 4383-4387.  
Zhao N J, Yang S Y, Li B. Expert consensus on Shenqi Jiangtang Granule in clinical application of type 2 diabetes [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2020, 51(17): 4383-4387.
- [2] 张晶,李冰冰,黄敏仪,等. 基于网络药理学的参芪降糖颗粒治疗2型糖尿病机制探讨 [J]. 中草药, 2020, 51(19): 4873-4883.  
Zhang J, Li B B, Huang M Y, et al. Mechanism of Shenqi Jiangtang Granules in treatment of type 2 diabetes based on network pharmacology [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2020, 51(19): 4873-4883.
- [3] 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): 507-515.  
Kang C C, Wang X C, Wu Z F, et al. Research progress on sterilization technology of Chinese materia medica powder based on physicochemical and biological evaluation [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2020, 51(2): 507-515.
- [4] 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.  
Feng S J, Wu Z F, Wang Y Q, et al. Current situation and problem analysis on sterilization process for Chinese materia medica [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2015, 46(18): 2667-2673.
- [5] 陈少平. 常用中药灭菌技术比较及其新技术介绍 [J]. 中国民族民间医药, 2013, 22(6): 104.  
Chen S P. Comparison of common traditional Chinese medicine sterilization technologies and introduction of new technologies [J]. Chin J Ethnopharmacology, 2013, 22(6): 104.
- [6] 崔璐,郑振秋. 关于覆盆子化学成分与药理作用的研究进展 [J]. 全科口腔医学电子杂志, 2020, 7(1): 192, 196.  
Cui L, Zheng Z Q. Research progress on the chemical constituents and pharmacological effects of *Rubus Chingii* Hu [J]. Electron J Gen Stomatol, 2020, 7(1): 192, 196.
- [7] 于俊杰,周兴卓,姜宏梅,等. 覆盆子的药理活性研究进展 [J]. 科技视界, 2019(35): 263-264.  
Yu J J, Zhou X Z, Jiang H M, et al. Research progress on the pharmacological activity of *Rubus Chingii* Hu [J]. Sci Technol Vis, 2019(35): 263-264.
- [8] 苏文俏. 天麻首乌片中生药粉灭菌工艺的研究及质量标准的提升 [D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2018.  
Su W Q. Research on sterilization process of Chinese crude drug powder in Tianma Shouwu Tablets and improvement of quality standards [D]. Changsha: Hunan University of Chinese Medicine, 2018.
- [9] 杨明龙. 苦荞皮层粉灭菌工艺及通便功效研究 [D]. 广州: 华南理工大学, 2019.  
Yang M L. Study on sterilization technology and defecation efficacy of Tartary buckwheat skin powder [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2019.
- [10] 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.  
Yan D, Yuan X, Xie D S, et al. Research status and thoughts on sterilization of Chinese herbal medicine pieces [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2016, 47(8): 1425-1429.
- [11] 王娇,屈云萍,杨斯斯,等. 不同灭菌方法对蜈蚣含氮量的影响研究 [J]. 亚太传统医药, 2016, 12(7): 27-28.  
Wang J, Qu Y P, Yang S S, et al. Influences of sterilization methods on the nitrogen content of *Scelopendra* [J]. Asia Pac Tradit Med, 2016, 12(7): 27-28.
- [12] 中国药典 [S]. 一部. 2020.  
Pharmacopoeia of the People's Republic of China [S]. Volume I. 2020.
- [13] 康超超,王学成,伍振峰,等. 当归原生粉乙醇灭菌工艺优化及其品质比较研究 [J]. 中草药, 2019, 50(6): 1341-1347.  
Kang C C, Wang X C, Wu Z F, et al. Optimization of ethanol sterilization technology for *Angelicae Sinensis Radix* and comparison of its quality [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2019, 50(6): 1341-1347.

- [14] 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.  
Wang R Z, Li S W. Study on dry-heat sterilization process of *Scutellaria Baicalensis Radix* powder [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2013, 44(15): 2092-2096.
- [15] 赵婷婷, 何承辉, 谭梅娥, 等. 基于多指标权重分析和单因素-正交实验优选前列爽颗粒醇提工艺 [J]. 化学与生物工程, 2020, 37(12): 45-50.  
Zhao T T, He C H, Tan M E, et al. Optimization in ethanol extraction process of qianlieshuang granules based on multi-index weight analysis and single factor-orthogonal experiments [J]. Chem Bioeng, 2020, 37(12): 45-50.
- [16] 邓俊杰. HPLC-Q-TOF-MS技术在覆盆子指纹图谱建立和化学成分归属中的应用 [J]. 海峡药学, 2020, 32(5): 23-26.  
Deng J J. Establishment of fingerprint and identification of the components in *Rubus chingii* Hu by HPLC-Q-TOF-MS [J]. Strait Pharm J, 2020, 32(5): 23-26.
- [17] Molnár H, Bata-Vidács I, Baka E, et al. The effect of different decontamination methods on the microbial load, bioactive components, aroma and colour of spice paprika [J]. Food Control, 2018, 83: 131-140.
- [18] 魏征. 圆叶葡萄多酚积累特性分析 [D]. 北京: 中国农业大学, 2017.  
Wei Z. Characteristics of polyphenol compounds accumulation in muscadine grapes [D]. Beijing: China Agricultural University, 2017.
- [19] 张建伟. 板栗壳斗鞣花单宁及其代谢产物鞣花酸和尿石素的生物活性研究 [D]. 北京: 北京林业大学, 2015.  
Zhang J W. Studies on biological activities of ellagitannins from UBurs of *Castanea mollissima*, and their metabolic products ellagic acid and urolithins [D]. Beijing: Beijing Forestry University, 2015.
- [20] 李喆, 刘博男, 张超, 等. 多指标综合评价结合层次分析法优化酸枣仁炒制工艺 [J]. 中成药, 2020, 42(8): 2089-2094.  
Li Z, Liu B N, Zhang C, et al. Cooking process optimization for *Ziziphus jujuba* by multi-index comprehensive evaluation with analytic hierarchy process [J]. Chin Tradit Pat Med, 2020, 42(8): 2089-2094.

[责任编辑 兰新新]