

黄芩粉的干热灭菌工艺研究

王睿陟, 李世文

桂林三金药业股份有限公司, 广西 桂林 541004

摘要: 目的 通过正交试验优化黄芩粉的灭菌工艺条件。方法 以微生物(细菌、霉菌)数量和黄芩苷的含量为评价指标, 选取加热温度、加热时间、药粉厚度为考察因素, 利用 $L_9(3^4)$ 正交试验确定了黄芩粉的灭菌工艺。结果 黄芩粉最佳灭菌工艺条件: 加热温度为 100 ℃, 加热时间为 10 h, 药粉厚度为 2 cm。结论 此工艺条件经工艺验证试验和大生产验证, 灭菌后黄芩粉的微生物指标可达到《中国药典》2010 年版要求, 重复性好, 且灭菌前后黄芩苷的含量无显著差异。

关键词: 黄芩粉; 灭菌; 黄芩苷; 正交试验; 微生物检查

中图分类号: R283.3 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2013)15-2092-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.15.013

Study on dry-heat sterilization process of *Scutellaria Baicalensis Radix* powder

WANG Rui-zhi, LI Shi-wen

Guilin Sanjiin Pharmaceutical Co., Ltd., Guilin 541004, China

Abstract: Objective Through orthogonal test to find out the scientific conditions for dry-heat sterilization process of *Scutellaria Baicalensis Radix* powder. **Methods** The microbial (bacterium and molds) quantity and the content of baicalin as the indexes, the temperature, time, thickness of powder as factors, the sterilization process for *Scutellaria Baicalensis Radix* powder was determined by $L_9(3^4)$ orthogonal test. **Results** The optimal technological conditions for sterilization were 100 ℃, 10 h, and the powder thickness of 2 cm. **Conclusion** This condition is proved by the amplified test and the large scale production, after the sterilization, the hygiene indexes of *Scutellaria Baicalensis Radix* powder can reach the requirements of *Chinese Pharmacopoeia 2010*. There is a good reproducibility but no significant difference for the content of baicalin before and after the sterilization.

Key words: *Scutellaria Baicalensis Radix* powder; sterilization; baicalin; orthogonal test; microbial examination

黄芩为唇形科植物黄芩 *Scutellaria baicalensis* Georgi 的干燥根, 苦、寒, 归肺、胆、脾、大肠、小肠经, 具有清热燥湿、泻火解毒、止血、安胎功能, 主治湿温、暑湿、胸闷呕恶、湿热痞满、泻痢、黄疸、肺热咳嗽、高热烦渴、血热吐衄、痈肿疮毒、胎动不安等^[1]。黄芩为常用中药材, 中成药制剂中常粉碎成细粉入丸散, 《中国药典》2010 年版中, 含有黄芩的中药品种 154 个, 其中以药粉入药的品种 71 个, 占 46.1%, 黄芩粉在处方中比例从 3% 到 50% 不等。

黄芩原药材药粉由于采收、运输、储存的粗放管理, 微生物数量较高, 而《中国药典》对微生物数量的要求越来越严格, 2010 年版中规定含药材原粉的口服给药制剂细菌数每 1 g 不得超过 10 000

cfu, 每 1 mL 不得超过 100 cfu, 霉菌和酵母菌数每 1 g 或 1 mL 不得超过 100 cfu。用于表皮或黏膜不完整的含药材原粉的局部给药制剂, 细菌数每 1 g 或 10 cm² 不得超过 1 000 cfu, 每 1 mL 不得超过 100 cfu; 霉菌和酵母菌数每 1 g、1 mL 或 10 cm² 不得超过 100 cfu。对黄芩粉之类以药粉入药的品种, 如何灭菌, 尚未见系统的研究报道。虽然热压灭菌方式对原药粉灭菌效果较好, 且被广泛采用, 但黄芩苷在湿热条件下易发生分解, 造成黄芩有效成分损失^[2], 为此, 本实验开展了黄芩粉的干热灭菌工艺研究, 摸索既能将原药材粉灭菌至规定要求, 又不破坏其有效成分的工艺参数。

1 仪器与材料

TG—Z—II 型热风循环烘箱(江阴市干燥成套

收稿日期: 2013-01-25

作者简介: 王睿陟(1974—), 男, 工程师, 执业中药师, 研究方向为生产技术管理。Tel: (0773)5593402 E-mail: 106799687@qq.com

网络出版时间: 2013-07-05 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/12.1108.R.20130705.1551.013.html>

设备厂), 循环风量: 3 400~3 500 m³/h, 安全使用温度<140 ℃。配套不锈钢托盘(85 cm×46 cm×4 cm)。

黄芩粉原料: 采用 LF—400 型烟台粉碎机正常生产出来的物料, 药粉水分 5%~8%, 细度 100% 过 140 目标准筛。

2 方法与结果

2.1 烘箱的热分布均匀性验证

主要目的是检查烘箱内热分布情况, 及烘箱内不同位置的温度偏差状况, 以确定可能存在的最冷点, 以保证灭菌效果。热分布的评价标准是烘箱内热分布均匀, 箱内各点的温度值与设定值偏差空载时≤2 ℃, 满载时≤3 ℃。若出现热分布不符合规定现象应及时调整进、回风量及循环风挡板, 改善空气流动状态, 使其达到规定要求。

2.1.1 空载热分布验证 空载状态下测定方法是使用经过校验合格(准确度达到±0.1 ℃)的铂电阻温度计编号 A1~A6, 按图 1 所示, 在烘箱内放置, 并通过数据线与外部计算机连接, 在其中有一点达到设定温度(80、100 ℃)时开始计时, 设定每隔 10 min 进行 1 次数据记录, 统计 2 h 温度变化情况, 结果见表 1。

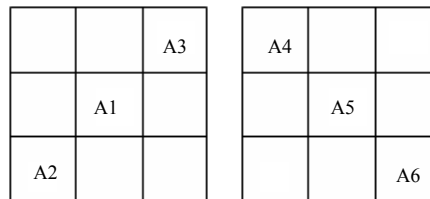


图 1 烘箱上层(左)和下层(右)温度计放置示意图

Fig. 1 Diagram of thermometer placed oven upper (left) and lower (right) layers

表 1 空载温度变化数据

Table 1 Data of temperature changes without loading

时间 / min	实测温度(设定温度 80 ℃) / ℃								实测温度(设定温度 100 ℃) / ℃							
	A1	A2	A3	A4	A5	A6	平均	极差	A1	A2	A3	A4	A5	A6	平均	极差
0	80.0	79.6	78.8	79.0	80.0	79.4	79.5	1.2	99.2	99.8	99.1	100.0	99.0	99.3	99.4	1.0
10	80.5	80.5	80.5	80.6	80.3	80.5	80.5	0.3	101.5	101.1	101.2	101.4	100.3	101.3	101.1	1.2
20	80.6	80.5	80.6	80.5	80.1	79.9	80.4	0.7	101.1	101.0	101.2	101.3	100.2	101.2	101.0	1.1
30	80.2	80.3	80.5	80.3	80.1	80.4	80.3	0.4	101.1	101.0	101.2	101.2	100.4	101.1	101.0	0.8
40	80.5	80.1	80.4	80.6	80.3	80.1	80.3	0.5	101.1	101.2	100.9	101.2	100.5	100.8	101.0	0.7
50	80.0	80.1	80.6	80.4	80.0	80.1	80.2	0.6	101.1	100.5	100.9	101.2	100.0	100.8	100.8	1.2
60	80.2	79.9	80.5	80.4	79.9	80.4	80.2	0.6	101.1	100.8	101.3	100.9	100.2	101.1	100.9	1.1
70	80.0	79.6	80.6	80.2	79.8	80.1	80.1	1.0	101.1	100.6	100.8	101.3	100.2	100.6	100.8	1.1
80	79.3	79.8	80.4	80.3	79.7	79.9	79.9	1.1	101.1	100.8	100.9	101.1	100.2	100.9	100.8	0.9
90	79.6	79.6	79.6	79.7	79.6	79.6	79.6	0.1	100.8	100.6	101.0	101.0	100.2	100.7	100.7	0.8
100	80.0	79.6	80.0	80.1	79.6	79.9	79.9	0.5	101.1	100.5	101.5	100.8	100.4	100.9	100.9	1.1
110	80.0	80.0	80.1	80.3	79.9	79.8	80.0	0.5	100.9	100.5	101.3	100.9	100.2	100.7	100.8	1.1
120	80.4	79.9	80.4	80.1	79.9	80.0	80.1	0.5	101.1	100.7	101.0	100.8	100.1	101.1	100.8	1.0

2.1.2 满载热穿透验证 在空载验证的基础上确定装载中的最冷点, 并确定该点在灭菌设定时间内能获得充分的灭菌保证值, 以达到灭菌效果。测定方法是烘箱内满载药粉, 使用经过校验合格(准确度达到 0.1 ℃)的铂电阻温度计编号 1~6, 按图 1 所示, 在烘箱内放置同时插入该处托盘内药粉的中部, 并通过数据线与外部计算机连接, 在其中有一点达到设定温度(80、100 ℃)时开始计时, 设定每隔 10 min 进行 1 次数据记录, 统计 2 h 温度变化情况, 结果见表 2。

2.1.3 烘箱热分布验证结果 验证结果表明, 80 ℃空载时温度分布为(80.1±0.4) ℃; 100 ℃空载时温度分布为(100.8±0.6) ℃; 80 ℃满载时温度分布为(80.7±0.8) ℃; 100 ℃满载时温度分布为(101.5±1.2) ℃, 不存在明显的冷点, 烘箱热分布均匀性良好。

2.2 干热灭菌方法

每次将黄芩粉按不同装量装入 6 个不锈钢托盘, 放在干燥架上, 放入热风循环烘箱中, 在一定的温度下加热一定的时间。

表2 满载温度变化数据

Table 2 Data of temperature changes with full loading

时间 / min	实测温度 (设定温度 80 °C) / °C								实测温度 (设定温度 100 °C) / °C							
	A1	A2	A3	A4	A5	A6	平均	极差	A1	A2	A3	A4	A5	A6	平均	极差
0	79.9	80.0	78.8	79.3	79.5	79.9	79.6	1.2	100.0	98.2	99.8	99.5	99.0	99.4	99.3	1.8
10	81.7	80.1	81.1	81.2	81.1	82.2	81.2	2.1	100.4	100.0	102.1	102.8	101.5	102.9	101.6	2.8
20	81.4	80.3	81.1	80.7	81.0	81.9	81.1	1.6	100.5	100.0	102.1	100.1	101.6	102.8	101.2	2.1
30	81.7	80.2	81.2	80.3	81.0	82.0	81.1	1.8	100.5	100.2	102.4	102.8	101.8	102.8	101.8	2.6
40	81.5	80.1	81.2	81.0	80.8	81.9	81.1	1.8	100.9	100.1	102.0	103.0	102.0	102.6	101.8	2.9
50	81.3	79.8	81.0	80.5	80.6	81.4	80.8	1.6	100.5	100.5	102.0	100.9	101.1	102.7	101.3	1.5
60	81.8	79.7	80.6	80.0	80.7	81.3	80.7	2.1	101.0	100.1	102.1	102.9	102.8	102.9	102.0	2.8
70	81.1	80.0	80.9	80.1	80.5	81.2	80.6	1.2	100.8	100.3	101.9	102.9	102.0	102.4	101.7	2.6
80	81.2	79.5	80.8	80.1	80.5	81.3	80.6	1.8	100.9	100.5	102.0	102.8	101.3	102.6	101.7	2.3
90	81.3	79.8	81.1	79.7	80.7	81.4	80.7	1.7	101.1	100.2	102.2	102.6	102.2	102.5	101.8	2.4
100	81.3	79.9	80.9	79.6	80.5	81.3	80.6	1.7	101.0	100.4	102.1	102.4	100.0	102.5	101.4	2.4
110	81.3	80.2	81.0	79.5	80.6	81.1	80.6	1.8	100.9	100.6	101.9	102.5	102.6	102.6	101.9	2.0
120	81.3	80.0	81.0	79.4	80.7	81.5	80.7	2.1	101.0	100.5	102.0	102.6	103.0	102.7	102.0	2.5

2.3 检验方法

2.3.1 微生物检验 取一定量的药粉,按《中国药典》2010年版规定的微生物检验方法进行检测。

2.3.2 黄芩苷量的测定 称取一定量的药粉,按《中国药典》2010年版规定的黄芩药材中黄芩苷量的测定方法进行检测。

(1) 色谱条件与系统适用性试验:以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂(菲罗门 Prodigy ODS(3) 250 mm×4.60 mm, 5 μm); 甲醇-水-磷酸(47:53:0.2)为流动相;检测波长为 280 nm。理论板数按黄芩苷峰计算不低于 2 500。

(2) 对照品溶液的制备:取在 60 °C 减压干燥 4 h 的黄芩苷对照品适量,精密称定,加甲醇制成含黄芩苷 60 μg/mL 的溶液,即得。

(3) 供试品溶液的制备:取灭菌后的黄芩药粉约 0.3 g,精密称定,加入 70%乙醇 40 mL,加热回流 3 h,放冷,滤过,滤液置 100 mL 量瓶中,用少量 70%乙醇分次洗涤容器和残渣,洗液滤入同一量瓶中,加 70%乙醇至刻度,摇匀。精密量取 1 mL,置 10 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,即得。

(4) 线性关系考察:精密称取在 60 °C 减压干燥 4 h 的黄芩苷对照品 10.10 mg,加甲醇使溶解并稀释至 25 mL,再精密量取此溶液 0.5、1、2、3、4、5 mL,分别置 10 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,即得。分别精密吸取上述溶液各 5 μL,依次注入液相色谱仪,测定峰面积,以黄芩苷进样量为横坐标

(X),黄芩苷峰面积为纵坐标(Y)进行回归分析,得回归方程 $Y=4\,334\,776\,X-31\,425$, $r=0.999\,9$,表明黄芩苷进样量在 0.101~1.01 μg 与峰面积呈良好线性关系。

(5) 测定法:分别精密吸取对照品溶液与供试品溶液各 10 μL,注入液相色谱仪,测定,即得。特征色谱图见图 2。

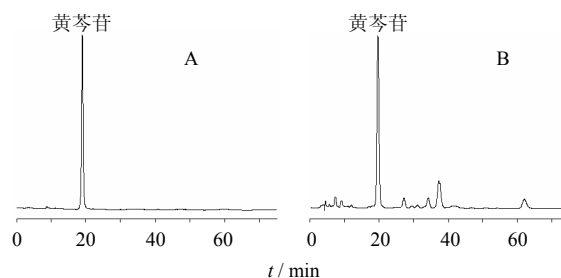


图2 黄芩苷对照品(A)、黄芩药粉(B)的HPLC色谱图
Fig. 2 HPLC chromatograms of baicalin reference substance (A) and *Scutellaria Baicalensis* Radix powder (B)

2.4 干热灭菌工艺条件的选择

2.4.1 条件摸索试验 影响原药粉干热灭菌效果的因素较多,如设备因素(循环风量、热分布均匀性等)、物料性质(水分、细度等)、加热温度、加热时间、物料厚度。其中设备因素是固定且经过验证达标的,物料水分和细度在生产过程中基本稳定,变化不大,故设备和物料本身因素在此不作为考查对象。

设备说明书中明确热风循环烘箱安全使用温度应 $<140\text{ }^{\circ}\text{C}$ ，且在试验中发现黄芩粉在 $120\text{ }^{\circ}\text{C}$ 连续受热 10 h 以上时会发生外观（色泽）变化，所以从设备安全和物料性状等方面考虑，干热温度应在 $120\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以下。

一般干热灭菌条件为 $160\sim 170\text{ }^{\circ}\text{C}$ ， $2\sim 4\text{ h}$ ^[3]，本实验所采用的温度 $<160\text{ }^{\circ}\text{C}$ ，所以干热时间应在 4 h 以上。

从生产效率和操作控制等方面综合考虑厚度的选择，装盘量应在 $1/2$ 盘（ 2 cm ）和满盘（ 4 cm ）之间较合适，故药粉厚度选择范围为 $2\sim 4\text{ cm}$ 。

2.4.2 正交试验及结果 以微生物检验数据、黄芩苷的量作为评价指标，以加热温度（A）、加热时间（B）、药粉厚度（C）为考察因素，选择 $L_9(3^4)$ 正交表进行试验，试验设计与结果见表3。

2.4.3 方差分析 从试验结果可知，各种试验条件下对霉菌的杀灭效果较好（除试验1外，霉菌数均 $\leq 10\text{ cfu/g}$ ）；黄芩苷的平均量为 12.9% ，与试验前的 13.5% 相比变化不大，故霉菌及黄芩苷的量只做为参考指标，不进行具体的方差分析。将正交试验结果中的细菌数进行方差分析，结果见表4。

以细菌数目为考察指标，由极差 R 值显示，各因素影响主次为 $A>C>B$ ；方差分析结果表明，灭菌温度、装药粉厚度对灭菌效果影响显著，灭菌时间影响无统计学意义，优选最佳水平分析如下：加热温度（因素A）对细菌灭菌效果影响显著（ $P<0.05$ ），具有统计学意义，为主要影响因素，极差分析结果表明，水平3比较好，因此选择加热温度为 $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ ；加热时间（因素B）无统计学意义，但极差分析结果显示，因素B水平 $3>2>1$ ，

表3 $L_9(3^4)$ 正交试验设计方案及结果

Table 3 Design and results of $L_9(3^4)$ orthogonal test

试验号	A / $^{\circ}\text{C}$	B / h	C / cm	D (空白)	细菌 / ($\text{cfu}\cdot\text{g}^{-1}$)	霉菌 / ($\text{cfu}\cdot\text{g}^{-1}$)	黄芩苷 / %
1	80 (1)	6 (1)	2 (1)	(1)	10 000	20	13.2
2	80 (1)	8 (2)	3 (2)	(2)	13 000	<10	13.7
3	80 (1)	10 (3)	4 (3)	(3)	14 000	<10	12.5
4	90 (2)	6 (1)	3 (2)	(3)	3 600	10	11.6
5	90 (2)	8 (2)	4 (3)	(1)	6 200	<10	13.3
6	90 (2)	10 (3)	2 (1)	(2)	1 200	<10	13.1
7	100 (3)	6 (1)	2 (1)	(2)	6 000	<10	13.2
8	100 (3)	8 (2)	4 (3)	(3)	200	<10	13.5
9	100 (3)	10 (3)	3 (2)	(1)	800	<10	12.1
K_1	37 000	19 600	11 400	17 000			
K_2	11 000	19 400	17 400	20 200			
K_3	7 000	16 000	26 200	17 800			
R	30 000	3 600	14 800	3 200			

厚度： 2 cm （托盘高度的 $1/2$ ，药粉量约为 3 kg/盘 ）； 3 cm （托盘高度的 $3/4$ ，药粉量约 4.5 kg/盘 ）； 4 cm （满托盘，药粉量约 6 kg/盘 ）。灭菌前黄芩粉细菌 $86\text{ }000\text{ cfu/g}$ ，霉菌 $1\text{ }700\text{ cfu/g}$ ，黄芩苷的量 13.5%

Thickness: 2 cm ($1/2$ of tray height, powder weight is about 3 kg/dish); 3 cm ($3/4$ of tray height, powder weight is about 4.5 kg/dish); 4 cm (full tray, powder weight is about 6 kg/dish). Baikal skullcap root powder before sterilization bacteria is $86\text{ }000\text{ cfu/g}$, mold is $1\text{ }700\text{ cfu/g}$, the content of baicalin is 13.5%

表4 方差分析

Table 4 Analysis of variance

误差来源	偏差平方和	自由度	F 值	显著性
A	176 888 888.889	2	95.67	$P<0.05$
B	2 728 888.889	2	1.48	
C	36 942 222.222	2	19.98	$P<0.05$
D (误差)	1 848 888.889	2		

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

且正交试验7号样品的细菌数量只达到了《中国药典》2010年版中口服固体制剂标准，为了提高灭菌效果保证产品质量，在质量、效率、成本之间权衡，选择水平3，即加热时间为 10 h ；药粉厚度（因素C）对细菌灭菌效果影响显著（ $P<0.05$ ），具有统计学意义，为主要影响因素，极差分析结果表明，水平1比较好，因此选择药粉厚度为 2 cm 。综上所述，黄芩粉的干热灭菌最佳工艺条件为 $A_3B_3C_1$ ，即

加热温度 100 ℃, 加热时间 10 h, 药粉厚度为 2 cm。

2.5 工艺验证试验

按正交试验确定的工艺条件 $A_3B_3C_1$, 加大批量, 取不同批次的黄芩粉各 50 kg 进行试验, 以验证以上灭菌工艺的有效性, 结果见表 5。工艺验证数据表明, 正交试验确定的工艺条件 $A_3B_3C_1$, 有较好的重现性, 对黄芩粉的灭菌效果较好, 可达到《中国药典》2010 年版规定的“用于表皮或黏膜不完整的含药材原粉局部给药制剂”用药微生物要求。

表 5 工艺验证物料微生物检测数据

Table 5 Microbial detection data of process validation materials

编号	细菌 / (cfu·g ⁻¹)		霉菌 / (cfu·g ⁻¹)	
	灭菌前	灭菌后	灭菌前	灭菌后
001	86 000	20	1 700	<10
002	78 000	120	1 200	<10
003	60 000	<10	1 500	10
004	82 000	40	1 800	<10
005	66 000	60	1 400	<10

2.6 大生产试验

将黄芩粉约 100 kg/次按优选的工艺条件进行灭菌, 然后与热压灭菌的其他药粉及辅料进行粉碎、混合生产成半成品, 半成品药粉送样进行微生物检查, 结果见表 6。大生产共试验 30 批, 微生物检验指标全部达到《中国药典》2010 年版要求, 表明优化的黄芩粉灭菌工艺条件是确实可靠的。

3 讨论

根据试验中各样品黄芩苷的测定数据与灭菌前数据比较, 可以看出黄芩粉采用干热灭菌法进行灭菌, 对药粉中主要指标成分黄芩苷的影响较小。

通过正交试验和放大试验, 本实验确定了黄芩粉的有效灭菌工艺条件: 加热温度 100 ℃, 加热时间 10 h, 药粉厚度为 2 cm。

实验结果表明, 干热灭菌对霉菌的杀灭效果较好, 细菌较难杀灭, 这正与理论上的细菌耐热不耐湿, 霉菌耐湿不耐热相吻合。

干热灭菌工艺因其设备简单、操作方便、生产成本较低等原因, 在实际大生产中是一种常用、经济的灭菌手段, 虽然其对物料本身性质有一定要求,

表 6 30 批大生产试验数据

Table 6 Test data of 30 batches of large-scale production

编号	细菌 / (cfu·g ⁻¹)		编号	霉菌 / (cfu·g ⁻¹)	
	(cfu·g ⁻¹)	(cfu·g ⁻¹)		(cfu·g ⁻¹)	(cfu·g ⁻¹)
1201	190	10	1216	110	<10
1202	170	<10	1217	60	10
1203	280	<10	1218	80	<10
1204	15	<10	1219	40	<10
1205	20	<10	1220	30	<10
1206	40	<10	1221	<10	<10
1207	<10	10	1222	<10	15
1208	75	10	1223	15	<10
1209	150	10	1224	<10	<10
1210	85	<10	1225	440	<10
1211	10	<10	1226	<10	<10
1212	80	<10	1227	150	<10
1213	80	<10	1228	20	<10
1214	130	10	1229	80	<10
1215	120	10	1230	10	<10

但对一些类似于药粉之类的特定物料采用工艺条件优化, 可达到有效灭杀微生物的效果, 符合《中国药典》2010 年版要求。

本实验主要目的是为有效成分或指标成分量受热压灭菌影响较大的药粉灭菌提供一个参考和思路, 但此工艺也存在局限性, 按《中国药典》2010 年版方法对样本中的微生物进行检验, 虽然达到了标准要求, 但灭菌后样本中还残存有一定量的细菌, 可能原因是细菌的种类比较复杂, 此工艺条件只杀死了绝大多数的非耐热菌, 残存的应为部分耐热菌芽胞, 故对耐热菌灭菌效果还有待进一步深入研究。因药材不同, 染菌的数量和种类不同, 因此在参考使用此条件时应慎重。

参考文献

- [1] 颜正华. 中药学 [M]. 贵阳: 贵州科技出版社, 1996.
- [2] 黄 龙, 康绍建. 不同灭菌方式对三黄药材灭菌效果及质量影响的考察 [J]. 云南中医中药杂志, 2010, 31(5): 51.
- [3] 范碧亭, 张兆旺. 中药药剂学 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1997.