

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

康超超¹, 王学成^{1*}, 伍振峰^{1*}, 李远辉¹, 刘旭海², 易兵³, 彭常春⁴, 杨明¹

1. 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
2. 江中药业股份有限公司, 江西 南昌 330096
3. 江西赫柏康华制药设备有限公司, 江西 南昌 330096
4. 江西济民可信药业有限公司, 江西 宜春 336000

摘要: 中药生药粉是中药制剂重要的中间体, 针对中药生药粉的灭菌操作是必不可少的关键操作单元, 直接影响着药品的安全性、有效性及质量稳定性。从有关中药生药粉的应用、特点、重要地位、灭菌的必要性进行概述, 并对现有中药生药粉灭菌技术的分类、优缺点和应用等方面进行系统分析, 进一步从灭菌率、物理化学及生物评价、化学残留等角度切入, 提出健全中药生药粉灭菌工艺的评价体系。结合中药生药粉粉体学性质, 进行多维质量评价, 选用适当的灭菌方法, 才能达到既保证灭菌后的中药生药粉内在质量, 又达到微生物限度的要求。

关键词: 中药生药粉; 灭菌工艺; 粉体学性质; 生物评价; 多维质量评价

中图分类号: R283 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2020)02-0507-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.02.030

Research progress on sterilization technology of Chinese materia medica powder based on physicochemical and biological evaluation

KANG Chao-chao¹, WANG Xue-cheng¹, WU Zhen-feng¹, LI Yuan-hui¹, LIU Xu-hai², YI Bing³, PENG Chang-chun⁴, YANG Ming¹

1. Key Laboratory of Modern Preparation of Traditional Chinese Medicine, Ministry of Education, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China
2. Jiangzhong Pharmaceutical Co., Ltd., Nanchang 330096, China
3. Jiangxi Hebai Kanghua Pharmaceutical Equipment Co., Ltd., Nanchang 330096, China
4. Jiangxi Jimin Kexin Pharmaceutical Co., Ltd., Yichun 336000, China

Abstract: Chinese materia medica powder (CMMP) is an important intermediate in the preparation of Chinese materia medica (CMM). Sterilization of CMMP is an essential key operation unit, which directly affects the safety, effectiveness and quality stability of CMM. In this paper, the applications, characteristics, important status and the necessity of sterilization of CMMP were summarized, and the classification, advantages and disadvantages and application of existing sterilization technology of CMMP were systematically analyzed from the perspective of sterilization rate, physicochemical and biological evaluation, and chemical residue, so as to further improve the evaluation system of sterilization technology of CMMP. Only by combining the characteristics of CMMP, adopting a multidimensional quality evaluation and selecting appropriate sterilization methods, the internal quality and sterility of CMMP after sterilization can be guaranteed.

Key words: Chinese materia medica powder; sterilization process; powdery properties; biological evaluation; multidimensional quality evaluation

收稿日期: 2019-11-20

基金项目: 江西省杰出青年人才项目(20162BCB23035); 江西省科学技术协会项目(赣科协字[2018]117号); 江西省5511重大专项(20182ABC28009); 江西中医药大学重点学科青年教师培养计划项目(2016jzzdxk007); 江西省中药学一流学科专项科研基金项目(JXSYLXK-ZHYA0005)

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

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、洗干、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^[1]。另外, 中药生药粉制备生产的环境条件相对较低(30 万级), 机械设备、包装材料等较为简陋, 手工操作比重大, 污染机会较多, 从而导致其易染菌。新版《药品生产质量管理规范》(新版 GMP) 规定入药前的中药生药粉需满足微生物限度要求, 而目前大部分中药生药粉的微生物含量超过国家标准。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。中药粉体比表面积大、易吸潮、结团, 且部分效应组分遇热不稳定, 最终导致灭菌不彻底、物理性质发生改变、化学成分损失、生物活性降低等共性问题。目前企业普遍使用湿热灭菌法, 但灭菌后的生粉成了熟粉, 亦导致了中药药性的转变, 从而使疗效发生改变。采用辐照灭菌改善粉体灭菌效果又存在辐照剂量超标、增加生产成本等问题。使得中药生药粉的灭菌成为中药制剂灭菌的难题之一。目前灭菌后中药生药粉的质量评价标准不完善, 仅以灭菌率与单一化学成分含量评价灭菌效果, 未能综合考虑粉体特性、初始菌含量、灭菌工艺及设备性能等因素来选择适宜的灭菌方式和工艺参数。在保证灭菌后粉体微生物含量低于规定限度的同时, 应最大限度保持粉体理化性质和药效药性不变。因此, 本文对中药生药粉灭菌技术及其灭菌后的多维质量评价体系进行综述, 以期全面提升中药生药粉灭菌技术的合理应用及深入研究提供新思路。

1 中药生药粉及其在中药制剂中的重要地位与灭菌必要性

1.1 中药生药粉应用及特点

中药生药粉即植物类、动物类和矿物类中药经粉碎后所得的粉体。以中药生药全粉入药的剂型有散剂、中药颗粒饮片和超微中药等, 某些丸剂、胶囊剂、片剂、膏剂可由部分中药生药粉加适宜的辅料制成^[2-3], 中药生药粉还兼有药用辅料和赋形剂的作用^[4]。超微中药是指在遵循中医药理论的前提下, 结合中药物料的特点, 采用现代超微粉碎技术, 将中药材、中药提取物及中药制剂微粉化制得的中药超微制剂, 如微米中药、纳米中药等, 它们保留了原中药饮片的全成分, 具有提高中药的生物利用度,

增强靶向性、缓释功能, 提高原有功效和增加新功效的作用, 已经引起科技和中医药界的广泛关注。然而, 中药生药粉一般由中药材和中药饮片打粉制成, 其微生物含量受到众多因素的影响, 中药材中含有大量的营养成分, 在生长、加工、运输、储藏等生产环节受到环境因素的影响, 将导致微生物的滋生, 而中药生药粉入药的药材品种, 由于其未经过溶剂提取、浓缩过程, 往往携带大量微生物。从卫生学角度上看实际生产, 多数存在细菌数、霉菌数超标的现象。因此需要考察筛选适宜的灭菌方式改善粉体的灭菌效果, 这成为保证以中药生药粉入药的中药制剂品质的关键。

1.2 中药生药粉在中药制剂中的重要地位

由于中药制成粉体后, 具有方便携带、节约药材、有效成分溶出快等优势, 能有效避免汤剂口感不好、煎煮费时、煎煮麻烦、携带不便等缺点, 中药生药粉入药作为汤剂的补充具有重要的意义^[5]。中药生药粉入药自古以来就是中药制剂的一种重要使用形式, 如传统散剂直接以中药生药粉入药, 大部分丸剂以药材细粉为原料制备而成^[6]。依据药材“加工”程度, 中药制剂可分为传统中药制剂与现代中药制剂 2 类, 对于固体制剂而言, 传统中药制剂主要以原生药粉末加工而成, 现代中药制剂主要以提取物浸膏粉加工而成, 中药生药粉在传统与现代中药制剂领域均占有不可替代的地位^[7]。目前由于超微粉碎技术、破壁技术和纳米技术的兴起, 直接口服中药饮片具有保留了原中药饮片的全成分、使用过程无须经过煎煮, 可直接口服或冲服、生物利用率高等优点, 作为中药产业的新业态, 因其服用方便、社会认知度高, 产业发展迅猛^[8]。据统计在《中国药典》2015 年版^[9]中, 中药生药粉直接入药的成方制剂有 893 种, 主要为中药丸剂、散剂及部分中药片剂、胶囊剂等固体制剂, 占全部中成药产品的 59.81%。统计结果如图 1 所示。



图 1 《中国药典》2015 年版中药生药粉入药的成方制剂中各类型占比

Fig. 1 Proportion of each type of CMMP into prescription preparation in Chinese Pharmacopoeia 2015 edition

1.3 中药生药粉灭菌必要性

灭菌工艺在中药制剂过程中是一个重要的环节,直接决定了制剂最终的质量。灭菌技术的发展和改进对研制高质量中药产品、促进中药产业的良性发展有着重要作用。《中国药典》2015 年版四部^[9]中规定了无菌制剂和非无菌制剂的微生物检查方法以及非无菌制剂中微生物含量的最大允许限度。因此,使用适当的灭菌工艺对中药制剂生产过程中的微生物的含量进行控制极为重要。在现代中药材生产中,以生药粉入药是中成药、保健食品等生产中常用的加工工艺,《药品 GMP 认证检查评定标准》第 7023 条^[10]规定:“直接入药的药材粉末,配料前应做微生物检查,中药材粉末符合微生物限度要求方可入药”。然而,在药品生产过程中往往因中药生药粉含有超标的细菌和霉菌,造成严重质量问题,给消费者和企业均带来极大风险。在中成药的生产过程中,中药生药粉的灭菌结果对成品能否符合质量要求关系极大,故在中药生药粉入药前,对微生物限度超标的中药生药粉必需采用合适的灭菌方式进行灭菌。

2 中药生药粉灭菌技术

根据粉体是否经过加热处理,粉体灭菌技术可分为热力、非热力灭菌。热力灭菌技术是中药生产企业普遍采用的方法,根据采用温度不同又分为巴氏杀菌(低温杀菌)、高温杀菌和超高温瞬时灭菌(UHT),根据压力的不同可分为高压蒸汽灭菌法、间歇灭菌法、流通蒸汽法等;非热力灭菌技术主要包括物理杀菌和化学杀菌 2 种类型,物理杀菌主要是指超高压杀菌、高压脉冲电场杀菌、脉冲强光杀菌、微波杀菌、放射线杀菌、紫外线杀菌;化学杀菌是指在物料中通过添加抑菌剂和防腐剂,主要分气体灭菌法和化学试剂灭菌法,气体一般指臭氧、环氧乙烷、二氧化碳等,化学试剂通常指乙醇、乙二醇、抗微生物酶等。综合各灭菌方法的优势,联合应用不同灭菌工艺也成为一种高效的灭菌趋势。中药生药粉灭菌方法的确定应考虑被灭菌中药生药粉的性质、灭菌方法的有效性和经济性、灭菌后中药生药粉的“性、效、用”等因素。

2.1 热力灭菌技术

利用加热升温的办法,使液体或气体升温,形成高温环境使物料中的微生物致死的措施,称之为热力灭菌。热力是一种应用最早、使用最广泛、效果最可靠的方法,19 世纪人们认识微生物后,杀菌

防病更有了针对性,利用热力防止感染的方法和设备不断得到改进和发展,至今仍被认为是最方便、可靠,且在物品上不残留有害物质的消毒与灭菌方法之一^[11-12]。

2.1.1 湿热灭菌法 湿热灭菌法是热力灭菌中最有效、最重要和最广泛的灭菌方法。中药生药粉的湿热灭菌方法是指将中药生药粉装载于灭菌柜中,利用热蒸汽作用于微生物营养体和芽孢,使其蛋白质变性从而杀灭微生物达到灭菌的目的^[13-14],一般采用高压蒸汽灭菌法和流通蒸汽灭菌法。王影等^[15]发现高压蒸汽灭菌法会使三七粉中三七皂苷 R_1 、人参皂苷 R_{g_1} 、人参皂苷 R_{b_1} 的含量显著降低,故三七粉不宜采用高压蒸汽灭菌法灭菌;邱桂香等^[16]将中药原生粉合坨后采用湿热灭菌法灭菌,虽细菌数大幅度降低,但是水分超标。

粉体的湿热灭菌法灭菌能力强、简便易行,但灭菌时需要经高温、高压作用,对不耐热、易水解、易吸潮、含有挥发油等特殊中药生药粉不适用,会引起外观颜色显著改变、降低挥发油含量、增加中药生药粉含水率从而降低货架期^[17]。湿热灭菌法的水蒸气具有比热大、穿透力强、成本低等优势,但是水蒸气容易凝水,使粉料结块、变潮,严重的导致水分超标,后续干燥打粉过程又将有新微生物污染,导致整体灭菌效率低,因此极易吸潮或吸潮后物性改变的中药生药粉不建议使用该方法。湿热灭菌生药粉的装载方式也极易影响灭菌率,由于中药生药粉之间空隙不大,装载薄厚不一,粉体与水蒸气接触的均匀性差,易导致灭菌效果不均一。

目前,中药生药粉的湿热灭菌大都在传统料盘式蒸汽灭菌罐中进行,粉体的手工装卸繁重易导致 2 次污染、效率低、耗能大等缺点,沈善明等^[18]指出采用单锥真空干燥机替代料盘式蒸汽灭菌罐对中药生药粉进行灭菌可极大地减少蒸汽冷凝在中药生药粉中,耗能少、污染低。

2.1.2 干热灭菌法 干热灭菌法是指利用干热空气作为导热介质作用于中药生药粉,通过破坏 DNA 来杀灭微生物的方法^[19]。由于导热介质是空气,能避免湿热灭菌导致的中药生药粉灭菌吸潮板结、干燥粉碎 2 次污染等问题,适用于耐高温极易吸潮的中药生药粉。然而空气的比热容较低,穿透力弱,加上粉体间隙小,可能导致灭菌效果不理想。干热灭菌法温度高、时间长、浮尘大、易污染,容易使得药粉颜色变深,外观性状改变,中药生药粉挥发

性成分损失率达 25%~40%。因此,含有挥发油、生物碱类、醌类、黄酮类等不同类型的热敏性成分和对外观色泽要求高的中药生药粉不适用干热灭菌法。但旭辉等^[20]考察不同灭菌方式对川芎药材细粉的灭菌效果及品质影响,结果干热灭菌会使川芎细粉中阿魏酸含量降低 77.3%,这是因为阿魏酸热稳定性差。王睿陟等^[21]通过正交试验优化了黄芩粉干热灭菌的工艺条件,结果表明干热灭菌效果好,重复性好,且灭菌前后黄芩苷的量无显著差异,克服了黄芩苷在湿热条件下易发生分解,造成黄芩有效成分损失的问题。

2.2 非热力灭菌技术

2.2.1 辐射灭菌法

辐射灭菌法主要指中药生药粉在⁶⁰Co- γ 射线或适宜的电子加速器发生的电子束的辐照下,其中微生物由于电离辐射导致 DNA 直接被破坏而达到灭菌目的的方法^[22]。近年来以⁶⁰Co作为主要辐射源在中药生药粉灭菌领域运用广泛,灭菌的效果好、效率高、节能,无需升温升压进行消毒灭菌而不破坏易挥发成分及热敏性物质,穿透力强、无残留,且灭菌均匀、速度快、时间短、操作简单,便于连续作业^[23],尤其针对动物药粉的灭菌应用广泛,克服普通灭菌方式(如净选、水洗、紫外线照射、干湿热灭菌等)处理动物药粉后,大部分动物药粉仍然无法达到药品卫生标准的弊端,进而解决用动物药配方制成的成品制剂卫生学检查难以合格的难题^[24]。李奉勤等^[25]对蜈蚣、土鳖虫、水蛭、蝉蜕、全蝎 5 种虫类动物药采用⁶⁰Co- γ 射线辐照灭菌法灭菌的辐照剂量达 3 kGy 时,卫生学指标可达到灭菌要求,且蜈蚣的含氮量、全蝎醇溶性浸出物、土鳖虫水溶性浸出物、水蛭含量均没有明显变化,表明⁶⁰Co- γ 射线辐照上述 5 种动物粉的灭菌方法有效可行,解决动物药粉灭菌难问题,且克服干热和湿热灭菌法灭菌温度高、时间长、破坏成分的弊端。

但本法存在药材品种局限性、辐照剂量超标与辐照源限制的弊端。1997 年卫生部发布了《⁶⁰Co 辐照中药灭菌剂量标准》(内部试行)的通知(卫药发[1997]第 38 号),规定了中药辐照灭菌时不同剂型的最大吸收剂量应不大于下列数值:散剂和片剂为 3 kGy,丸剂为 5 kGy,中药原料粉为 6 kGy,以及允许辐照的中药材品种共计 198 种中成药 70 种。且明确规定秦艽、龙胆(含龙胆苦苷)及其制品不能用此法灭菌^[23]。目前很多中药制药企业仍存在滥用

辐照灭菌的情况,导致辐射剂量远远超过国际标准,严重影响有效化学成分和疗效。大麦麦苗粉在辐照剂量为 0~4 kGy 处理后,其蛋白质、总糖、游离总氨基酸、维生素 E、粗纤维、叶绿素与对照品无显著差异,而经 11 kGy 辐照处理其维生素 E 的含量下降约 38%^[26]。陈志军等^[27]研究电子束和 γ 射线 2 种射线的不同辐照剂量对灵芝孢子粉微生物和品质的影响,结果表明辐照量 4 kGy 以内可灭活微生物,当辐照低于 8 kGy 时,电子束和 γ 射线辐照对灵芝孢子粉的多糖质量分数均无明显影响,而高于 8 kGy 时,其多糖质量分数有显著变化。因此,针对辐照灭菌要严格控制辐照量,保证中药生药粉的品质,并进行致畸、致癌、致突变的特殊毒性检查,以确保灭菌安全性。⁶⁰Co- γ 辐照受辐射源的限制,需要运输到专门的机构灭菌,大大提高灭菌成本。且辐照灭菌涉及 GMP 管理、工艺变更及产品标识等问题,需要进一步规范管理。

2.2.2 微波灭菌法

微波灭菌是指中药生药粉中的微生物在高频率电磁场产生热效应和非热效应的作用下灭活从而达到灭菌效果。对原生药粉进行微波灭菌,灭菌后原生药粉的含菌量比未经处理的样品减少 99%,相对低温保持其有效成分基本上没有被破坏,升温迅速均匀,一般灭菌时间为 3~6 min,使物料内外同时加热,热转换效率高,节约能源,无死角残留,绿色环保,药品质量有保证,能耗费用较低,可实现自动控制及连续化生产^[28],其缺点是不适用于含水量低的药粉^[29]。苏文俏^[30]对天麻首乌片中生药粉采用湿热灭菌、微波灭菌、乙醇气体灭菌、⁶⁰Co- γ 辐照灭菌方法进行处理,以外观、灭菌效果、薄层鉴别、有效成分含量为评价指标,比较研究表明,单味药天麻粉、川芎粉、制何首乌粉均适合采用微波灭菌或⁶⁰Co- γ 辐照灭菌,综合考虑灭菌效果、对化学成分的影响、操作性及成本,3 者的混合药粉采用微波灭菌法进行灭菌。严焕熊等^[31]采用隧道式微波对灵芝孢子粉灭菌工艺进行优选,以灭菌效果、灵芝孢子粉质量为指标,采用单因素试验对润湿剂、物料粒度、物料厚度、微波时间进行考察,结果最佳工艺为 75%乙醇润湿剂,30 目筛粒度,1 cm 物料厚度,10 min 微波灭菌时间,实验结果表明细菌总数、霉菌和酵母菌均符合食品卫生学要求,灵芝孢子粉的水分及多糖含量均符合质量要求,灭菌效果佳,且灵芝孢子粉质量达标,表明该微波灭菌工艺适用于灵芝孢子粉的灭菌,

可应用于工业化生产。

2.2.3 环氧乙烷灭菌法 环氧乙烷低温灭菌技术是指将中药生药粉放置于环氧乙烷灭菌器内, 利用其烷化作用, 使微生物组织内维持生命所必需的物质惰化, 从而不可逆的杀死微生物, 达到灭菌效果。环氧乙烷气体杀菌力强、杀菌谱广, 可杀灭各种微生物, 包括细菌芽孢, 具有不损害灭菌物品且穿透力强等特点^[32], 其适合含有挥发性成分及热敏成分中药生药粉的灭菌^[33]。王赞英等^[34]选用环氧乙烷灭菌器对肺癆散进行灭菌, 采用气体浓度 6.67 kg/m^3 , 灭菌 5 h, 温度为 $45 \sim 50 \text{ }^\circ\text{C}$ 的条件, 结果粉体灭菌前后外观无变化, 微生物全灭活, 卫生学检查符合标准, 样品放置 12 d 后环氧乙烷残留量停留在 5×10^{-6} 不变, 远远低于国外要求安全残留量 5×10^{-5} , 服用环氧乙烷灭菌处理的肺癆散进行毒副作用实验表明无异常, 总体表明本法适合中药生药粉的灭菌。林杨等^[35]和周佩卿等^[36]分别采用环氧乙烷对祛咳散和抗肿瘤散进行灭菌处理, 结果中药生药粉外观无变化, 菌检结果符合卫生标准, 残留量低、无毒副作用。但是含氯的物品及能吸附环氧乙烷的中药生药粉则不宜使用本法灭菌^[37], 由于环氧乙烷是易燃易爆、有毒气体, 对环氧乙烷灭菌装置安装操作、使用管理有其特殊要求。然而, 由于环氧乙烷具有潜在致癌作用, 欧盟禁止使用环氧乙烷进行灭菌^[38]。

2.2.4 乙醇灭菌法 乙醇灭菌法是指以一定浓度的乙醇浸润或喷撒于中药生药粉上保持一定的温度, 利用乙醇渗透至微生物内使蛋白质变性的原理达到灭菌的目的^[39]。乙醇灭菌能最大程度地减少有效成分损失、无有害残留、绿色环保、工艺成本低、应用广泛^[40]。乙醇灭菌法采用了较低的灭菌温度 (65 ± 10) $^\circ\text{C}$, 使样品中可能含有的热敏性成分和易挥发性成分最大限度地得以保全, 从而进一步保证了药效, 同时解决了中药生药粉易湿的问题。张海江等^[41]考察了 75%乙醇对三七粉的灭菌效果, 利用湿法混合颗粒机混合加入乙醇, 混合均匀后加入密封储存灭菌一定时间, 结果采用药材量 30% 比例的 75%乙醇灭菌 48 h, 对三七粉的灭菌效果最佳, 细菌灭菌率达 98.92%, 霉菌全部灭活, 有效成分人参皂苷 Rg_1 、人参皂苷 Rb_1 及三七皂苷 R_1 灭菌前后的含量无明显变化。康超超等^[42]采用响应面法对当归生药粉灭菌工艺条件进行优化, 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 $78 \text{ }^\circ\text{C}$, 灭菌率达 99.59%, 并且品质优于常规灭菌法。王娇

等^[40]分析了乙醇灭菌法和 $^{60}\text{Co-}\gamma$ 灭菌法对蜈蚣粉的灭菌效果及其含氮量的影响, 结果表明 2 种方法对蜈蚣粉的灭菌均有效, 其中乙醇闷润时间达到 24 h 时, 微生物达卫生学要求, 含氮量无明显变化。

2.2.5 臭氧灭菌法 臭氧灭菌是中药生药粉与臭氧充分接触, 利用臭氧极强的氧化性迅速杀灭中药生药粉中的各种细菌繁殖体和芽孢、病毒、真菌^[43], 并且臭氧最终又分解成氧气, 因此臭氧灭菌是一种安全、环保、高效、无残留的新兴灭菌技术, 由于能低温操作尤适用于含挥发性、热敏性、糖分高、易霉变、富含油脂类成分的中药材的灭菌, 如丁香、肉桂、制乳香、制没药等原生药粉, 因这些中药富含芳香与树脂类成分, 在高温、高湿环境下易吸湿、结块、挥发。 $^{60}\text{Co-}\gamma$ 灭菌、环氧乙烷灭菌又可能分别存在“辐射源限制”“化学”残留等问题而影响其大规模运用, 因此, 对中药生药粉采用新型的臭氧灭菌工艺显得尤为重要^[44]。舒祝明^[45]研究臭氧灭菌处理丁桂活血散粉末的效果, 结果其微生物限度符合规定, 有效成分未被破坏, 质量稳定, 表明臭氧灭菌应用于中药生药粉的灭菌具有广阔的应用前景。但是臭氧不稳定和穿透性弱, 与中药生药粉的接触均匀性是影响臭氧灭菌效果的主要因素之一, 对臭氧不易接触的纵深处粉体细菌杀灭能力低, 如何使得粉体与臭氧充分均匀接触能显著提高本法对中药生药粉的灭菌效果。宋丽丽等^[46]采用粉体气悬浮臭氧逆流接触灭菌法对砂仁、豆蔻等原生药粉及六味地黄丸等制剂的混合药粉进行灭菌处理, 结果臭氧灭菌法样品的灭菌率平均为 95.24%, 比干热灭菌法高 6.81%, 稍低于 $^{60}\text{Co-}\gamma$ 灭菌法和流通蒸汽灭菌法, 但对样品化学成分的影响较小, 其优越性高于流通蒸汽灭菌法和干热灭菌法。

2.3 联合灭菌法

鉴于上述各中药生药粉单一式的灭菌技术的优势与不足, 开发具有良好协同效应的联合灭菌技术, 使得中药生药粉经过较温和的灭菌处理便能达到预期的微生物限度以下且保证较高品质是十分必要的。各灭菌技术间扬长避短互相联合, 可以发挥最大灭菌优势。过热蒸汽真空粉末灭菌系统将过热蒸汽灭菌技术与真空技术结合, 具有瞬间灭菌效果, 灭菌时间为 $0.5 \sim 5 \text{ s}$, 且注入的过热蒸汽的温度为 $110 \sim 180 \text{ }^\circ\text{C}$, 可以降低过热蒸汽的灭菌时间和工作温度, 避免粉末长时间处于高温状态而破坏其有效成分, 提高工作效率, 降低工作成本^[47]。将过热蒸

汽灭菌法灭菌时间短的优点与臭氧灭菌法无需加热、有效浓度低、用后无残留的优点相结合应用于蒜片灭菌,臭氧处理后使得脱水蒜片的初始菌落数降低,从而较短时间的蒸汽处理便可达到预期的灭菌效果,并且相比单一灭菌法较大程度保全了蒜片品质不改变^[48]。还有蒸汽与微波联合灭菌法^[49]、超声波与热处理及高压处理联合灭菌法^[50]、高压与CO₂联合灭菌法^[51]等均有良好的灭菌效果。联合灭菌法在食品灭菌领域研究较多,但也为其在中药生药粉灭菌中应用提供研究思路与参考意义。

3 中药生药粉灭菌工艺多维质量评价

针对粉体灭菌效果的评价,目前主要以灭菌率和其微生物含量降低到非无菌制剂的微生物限度以下来评价,关于中药生药粉灭菌处理后对成品的物理、化学及生物活性特征的研究非常少,因此建立一套适宜的“理化特性及生物评价体系”是中药生药粉灭菌技术需要解决的另一个关键科学问题,对于指导中药固体剂型研究、生产及质量控制具有重要的意义^[52]。

3.1 灭菌率及是否达微生物限度要求

中药生药粉无论何种灭菌方式,灭菌效果首要评价指标之一就是中药生药粉灭菌后,其微生物含量是否达到微生物限度要求。《中国药典》2015年版四部通则^[9]对药物制剂卫生标准的结果判定依据均做出了明确规定,其中中药生药粉大都属于药用原料,药典规定药用原料需氧菌总数不得超过1000 CFU/g、霉菌和酵母菌总数不得超过100 CFU/g、控制菌不得检出沙门菌、耐胆盐革兰阴性菌应小于 1×10^4 CFU/g。微生物检查作为药品安全性的重要指标,《中国药典》2015年版规定微生物计数法有平皿法、薄膜过滤法、最大可能数法(MPN)。大多数文献均采用平板计数法^[53-54]测定菌落数,得到灭菌率,灭菌率的计算公式为灭菌率=(灭菌前菌落数-灭菌后菌落数)/灭菌前菌落数^[55-56]。

3.2 化学成分的变化研究

中药生药粉的活性成分在保证药品安全有效的重要指标,质量就是疗效,在对中药生药粉进行灭菌后,不能仅考虑灭菌率,更应保证灭菌达卫生学的要求尽可能保全有效成分不受破坏。在衡量中药生药粉的化学成分在灭菌前后是否变化,往往依据《中国药典》2015年版,其中最多用一种化学成分作为多种药材或饮片的质量控制指标,往往存在一定的局限性,并不能完全保证临床用药的有效性和

安全性。张芳等^[57]对当归粉的微波灭菌工艺进行了研究,且对阿魏酸的含量进行了测定。但是当归中挥发油是一类重要的活性组分,应纳入到微波灭菌工艺的评价体系之中。因此,对于灭菌处理后的中药生药粉的化学成分的评价不能以单一的活性成分来评价灭菌效果的优劣,应建立指纹图谱进行综合判定。苏文俏^[30]在优选天麻首乌片中生药粉的灭菌工艺上不仅采用薄层鉴别、有效成分含量为评价指标,而且采用指纹图谱综合评价灭菌工艺,判定不同灭菌工艺对生药粉化学成分的影响,结果表明建立的指纹图谱方法简便、准确稳定、重复性好,为天麻首乌片的质量控制提供了有效的手段。

3.3 物理性质变化研究

中药生药粉的物理性质十分复杂,对制剂的性质和质量评价有着重要的影响。采用灭菌手段处理中药生药粉,忽略灭菌法对中药生药粉物理性质的影响,单纯考虑的灭菌前后粉体的化学成分变化不能完全保证该灭菌法是否适用于中药生药粉的灭菌。鉴于此,考察灭菌前后中药生药粉的物理性质也具有重要的意义。灭菌前后中药生药粉的颜色、形貌结构、表面性质等改变,将严重影响后续制剂成型性、吸水性、吸湿性、流动性、密度、压缩性等及其他与制剂相关的性质。如用湿热灭菌法,灭菌后药粉会变色、结块,色差可影响药物的外观品质,粉体结块后不便于后续制剂。粉体的颜色可利用色彩色差计转换为量值,微观形貌结构可采用扫描电镜(SEM)、投射电镜(TEM)等测定,接触角测定的常用方法包括透过高度法与视频光学接触角测定法^[58]。

3.4 生物活性评价研究

中药生药粉成分和靶点复杂多样,且药效是中药存在的价值基础和基本属性,灭菌前后中药原生粉理化性质的保证只是药效保证的基础,因此有必要采取生物活性评价手段判定中药原生粉灭菌前后药效是否变化。每种中药生药粉有其独特的药理活性,如抗氧化、抗菌、抗病原体、抗炎、镇痛、抗肿瘤等广泛药理作用,应根据具体中药原生粉的药理活性选择合适的药效模型进行表征。例如,分析1,1-二苯基-2-三硝基苯肼自由基(DPPH)、超氧自由基(O₂⁻)、羟自由基(OH)的清除能力进行体外抗氧化能力评价^[59];采用平板打孔法、滤纸片法、牛津杯法等定性实验与最小抑制浓度测定法为定量实验评价模型药的抑菌能力^[60];以小鼠耳肿胀法、

小鼠腹腔毛细血管通透法及大鼠足肿胀法进行抗炎作用的评价;以热板法、小鼠扭体法及电刺激法进行镇痛作用的评价^[61-62];体内外抑瘤实验相结合评价模型药抗癌效果^[63]。明确灭菌前后中药生药粉药效,使其灭菌工艺的质量控制标准提高,将产生显著经济和社会效益。

3.5 灭菌法残留限度

灭菌过程引入中药生药粉的辐射残余量、乙醇、环氧乙烷残留量等也需要检测是否达安全用药的要求,来保证后续制剂的安全性。辐射残余量一般采用光释光法(PSL)和热释光法进行测定,其中光释光法是一种较为成熟的辐照残留检测方法,热释光法样品前处理较为烦琐^[64]。针对中药生药粉乙醇灭菌后是否有微量乙醇残留的问题,主要测定方法以气相色谱法为主,同时重铬酸盐氧化分光光度法、蒸馏法以其快速、准确、操作简便、所需分析仪器简单的特点也常用于测定微量乙醇的含量^[65]。环氧乙烷残留量可采用微波萃取-比色分析法、顶空-气相色谱法^[66]、乙酰丙酮比色法^[67]进行测定。

4 展望

中药生药粉灭菌工艺是保障中药制剂质量和疗效的关键制造单元,目前传统灭菌技术存在色变、板结、成分破坏等物理化学性质及药效药性的改变,甚至有毒物质的残留等缺点。目前,超高压杀菌与高压脉冲电场灭菌在食品灭菌领域应用较成熟。其中超高压杀菌具有冷杀菌的特点,保持食品的营养价值、色泽及风味,具有速冻及不冻冷藏效果,延长食品的保质期,简化食品加工工艺,原料的利用率高、节约能源、无残留、无“三废”污染等优点^[68];高压脉冲电场灭菌具有杀菌时间短、低耗,处理后的食品物理性质、化学性质、营养成分上改变很小,风味、滋味无差异,杀菌的效果明显,达到商业无菌的要求,特别适合于热敏性很高的食品等优点^[69]。低温等离子体灭菌、脉冲强光杀菌等在食品杀菌方面新兴的环境友好型的灭菌技术,降低微生物数量的同时能够更好地保持食品固有营养成分、色泽和新鲜度,保证食品质量安全^[70]。但其在中药生药粉灭菌领域中的应用却较少,因此有必要通过参考食品灭菌技术,进一步加强中药生药粉灭菌技术的开发研究。中药生药粉的传统灭菌技术众多,要克服传统灭菌技术的缺点从而达到与中药制剂的制备工艺相适宜,发挥各项灭菌技术的特点,扬长避短、相互联合,向集成化和模块化方向发展

新技术,将在食品等领域应用的新兴灭菌技术科学合理地应用于中药生药粉灭菌,科学系统地评价灭菌效果等目标,需要药剂学学者的共同努力及其他学科人员的大力参与。借鉴食品领域的灭菌技术,开展中药生药粉灭菌技术的应用基础研究,对灭菌工艺进行多维评价,促进中药生药粉灭菌工艺及其设备的完善和开发,对灭菌粉体从多个角度综合评价,基于物理、化学及生物学的评价体系,将大大推动新技术和新设备在中药生药粉灭菌领域的合理应用,从而有效保障中药制剂的安全有效。

参考文献

- [1] 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.
- [2] 刘玉玮. 中医古代文献中的中药丸剂理论 [J]. 时珍国医国药, 2011, 22(1): 260-261.
- [3] 王国军. 浅谈中药膏方制备工艺与质量评价 [J]. 浙江中医药大学学报, 2019, 43(3): 266-269.
- [4] 蒋且英, 曾荣贵, 赵国巍, 等. 中药粉体改性技术与改性设备研究进展 [J]. 中草药, 2017, 48(8): 1677-1681.
- [5] 江泳, 冯欣, 杨殿兴, 等. 对中药煮散剂现状的认识与思考 [J]. 四川中医, 2010, 28(5): 69-71.
- [6] 杨泽锐, 彭丽华, 邓雯, 等. 中药粉体的发展历史概述 [J]. 安徽农业科学, 2016, 44(12): 141-143.
- [7] 侯世祥. 现代中药制剂设计理论与实践 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2010.
- [8] 徐超. 直接口服中药饮片存在的问题及对策 [J]. 中国食品药品监管, 2018(10): 66-69.
- [9] 中国药典 [S]. 四部. 2015.
- [10] 卫生部令第79号药品生产质量管理规范: 2010年修订 [S]. 2011.
- [11] 张朝武. 热力消毒与灭菌及其发展 [J]. 中国消毒学杂志, 2010, 27(3): 322-326.
- [12] 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.
- [13] Coleman W H, Zhang P, Li Y Q, *et al.* Mechanism of killing of spores of *Bacillus cereus* and *Bacillus megaterium* by wet heat [J]. *Lett Appl Microbiol*, 2010, 50(5): 507-514.
- [14] Tabit F T, Buys E. The effects of wet heat treatment on the structural and chemical components of *Bacillus sporothermodurans* spores [J]. *Int J Food Microbiol*, 2010, 140(2/3): 207-213.
- [15] 王影, 张德柱. 高压蒸汽灭菌法对三七细粉中3种成分含量的影响 [J]. 中国药业, 2014, 23(7): 4-5.

- [16] 邱桂香, 孟昭慧. 关于中药粉灭菌方法的探讨 [J]. 黑龙江医药, 1995, 8(3): 149-150.
- [17] Demirci A, Ngadi M O. *Microbial Decontamination in The Food Industry: Novel Methods and Applications* [M]. Philadelphia: Woodhead Publishing, 2012.
- [18] 沈善明, 朱丰金. 提高中药粉粒体蒸汽灭菌的效率和节能探讨 [J]. 医药工程设计, 2012, 33(1): 51-52.
- [19] Xing Y, Li A, Felker D L, et al. Nanoscale structural and mechanical analysis of *Bacillus anthracis* spores inactivated with rapid dry heating [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2014, 80(5): 1739-1749.
- [20] 但旭辉, 徐小彬, 黎明, 等. 川芎灭菌方法研究 [J]. 广西中医药, 2013, 36(3): 80-81.
- [21] 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.
- [22] Luo D, Zhao S, Tang Y, et al. Analysis of the effect of ^{60}Co - γ irradiation sterilization technology on the chemical composition of saffron using UPLC and UPLC/Q-TOF-MS [J]. *J Anal Methods Chem*, 2018, doi: 10.1155/2018/2402676.
- [23] 李计萍. γ 射线辐照灭菌法在中药及其制剂中应用现状和相关问题讨论 [J]. 中国中药杂志, 2007, 32(19): 2078-2081.
- [24] 官仕杰, 阎小平. 钴 60 辐照灭菌在含动物药类的中成药中的应用 [J]. 时珍国药研究, 1997, 8(6): 507-508.
- [25] 李奉勤, 史冬霞, 叶晓红, 等. 探讨 ^{60}Co - γ 射线辐照对蜈蚣等 5 种虫类药材灭菌效果的影响 [J]. 时珍国医国药, 2006, 17(11): 2348-2349.
- [26] 赵小俊, 史建君, 孙志. 大麦苗粉辐照杀菌及其主要成分的影响 [J]. 浙江大学学报: 农业与生命科学版, 2007, 33(1): 108-112.
- [27] 陈志军, 岳玲, 孔秋莲, 等. 两种辐照方式对灵芝孢子粉灭菌效果及品质影响的比较 [J]. 食品与生物技术学报, 2015, 34(11): 1212-1218.
- [28] 伍振峰, 冯少俊, 万娜, 等. 中药及其制剂微波灭菌技术应用现状分析 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2016, 18(10): 1771-1775.
- [29] 陈少平. 常用中药灭菌技术比较及其新技术介绍 [J]. 中国民族民间医药杂志, 2013, 22(6): 104-104.
- [30] 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.
- [31] 严焕雄, 曾荣华, 李咏华, 等. 隧道式微波对灵芝孢子粉的灭菌实验研究 [J]. 现代中药研究与实践, 2013, 27(6): 66-68.
- [32] 冯春. 环氧乙烷灭菌原理及未来发展方向 [J]. 医疗装备, 2013, 26(1): 16-17.
- [33] 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.
- [34] 王赞英, 夏志林. 环氧乙烷用于肺癆散灭菌效果的实验研究 [J]. 福建医药杂志, 2002, 24(2): 78.
- [35] 林扬, 刘家宜. 环氧乙烷用于祛咳散灭菌效果实验研究 [J]. 海峡药学, 1999, 11(1): 69-70.
- [36] 周佩卿, 董文琪. 环氧乙烷用于中药散剂灭菌效果实验的研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 1996, 2(4): 42-43.
- [37] 孙昱. 中药灭菌方法探讨 [J]. 中国临床药理学杂志, 2018, 34(19): 2380-2382.
- [38] Waje C K, Kim H K, Kim K S, et al. Physicochemical and microbiological qualities of steamed and irradiated ground black pepper (*Piper nigrum* L.) [J]. *J Agric Food Chem*, 2008, 56(12): 4592-4596.
- [39] Zhang Z, Jiang B, Liao X, et al. Inactivation of *Bacillus subtilis* spores by combining high-pressure thermal sterilization and ethanol [J]. *Int J Food Microbiol*, 2012, 160(2): 99-104.
- [40] 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.
- [41] 张海江, 朱文灯, 苏光. 75%浓度的乙醇对三七粉灭菌效果的研究 [J]. 机电信息, 2017(14): 33-35.
- [42] 康超超, 王学成, 杨明, 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.
- [43] 姜雪, 于鹏. 臭氧在食品行业中的发展和应用 [J]. 食品科技, 2014, 39(4): 110-113.
- [44] 胡彦君, 王雅琪, 伍振峰, 等. 臭氧灭菌技术在中药及其制剂应用中的研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2015, 40(16): 3137-3141.
- [45] 舒祝明. 丁桂活血散的臭氧灭菌方法考察 [J]. 海峡药理学, 2011, 23(12): 18-19.
- [46] 宋丽丽, 范丙义, 谷传动, 等. 中药粉气悬浮臭氧逆流接触灭菌方法的研究 [J]. 中国药理学杂志, 2005, 40(9): 684-688.
- [47] 陶海涛. 过热蒸气真空粉末灭菌系统: 中国, 201820103521.3 [P]. 2018-01-22.
- [48] 王书兰. 臭氧联合过热蒸汽对脱水蒜片减菌效果的研究 [D]. 南京: 南京农业大学, 2015.
- [49] Zanoelo E F, Cardozo-Filho L, Cardozo-Júnior E L. Superheated steam-drying of mate leaves and effect of drying conditions on the phenol content [J]. *J Food Process Eng*, 2006, 29(3): 253-268.
- [50] 白丽青, 马晓建. 食品过热蒸汽干燥的研究进展 [J]. 食品研究与开发, 2008, 29(6): 180-183.
- [51] Ross A I V, Griffiths M W, Mittal G S, et al. Combining nonthermal technologies to control foodborne microorganisms [J]. *Int J Food Microbiol*, 2003, 89(2/3): 125-138.
- [52] 杨明. 中药药剂学学科研究进展与发展思路 [J]. 中

- 药与临床, 2011, 2(4): 1-7.
- [53] 王忠东, 于建焕. 食品卫生微生物学检验菌落总数测定方法的效果分析 [J]. 临床医药文献电子杂志, 2015, 2(20): 4285-4286.
- [54] 张倩. 食品微生物检验中菌落总数测定的分析 [J]. 食品工程, 2011(1): 13-14.
- [55] 彭凯, 吴薇, 李丽, 等. 微波杀灭玉米霉菌的工艺优化及品质分析 [J]. 饲料工业, 2016, 37(11): 59-64.
- [56] 陈云妮, 谭坯梁, 冯纪南. 鹅肥肝微波灭菌工艺研究 [J]. 现代农业科技, 2018(17): 234-235.
- [57] 张芳, 康三江, 张永茂, 等. 当归微波干燥灭菌工艺优化研究 [J]. 中国现代中药, 2017, 19(10): 1461-1465.
- [58] 韩丽, 张定堃, 林俊芝, 等. 适宜中药特性的粉体改性技术方法研究 [J]. 中草药, 2013, 44(23): 3253-3259.
- [59] 张四杰, 钱正, 刘京晶, 等. 铁皮石斛花中花色成分抗氧化性和稳定性研究 [J]. 中国中药杂志, 2018, 43(10): 2025-2031.
- [60] 冉棋, 赵卓卓, 刘秀琨, 等. 天然药物抑菌活性实验方法的研究概述 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(20): 214-221.
- [61] 熊玉兰, 荆宇, 尚明英, 等. 细辛非挥发性提取物抗炎镇痛作用研究 [J]. 中国中药杂志, 2009, 34(17): 2252-2257.
- [62] 李凤金, 王博, 霍金海, 等. 桉椰子醇提取物对小鼠/大鼠的镇痛、抗炎作用 [J]. 中国药房, 2019, 30(1): 59-63.
- [63] 罗颖颖, 严新, 谢欣序, 等. 白头翁总皂苷及其主要成分抗肿瘤药效及其构效关系的研究 [J]. 中国现代中药, 2018, 20(7): 791-796.
- [64] 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.
- [65] 莫允焕, 薛健长, 曾小波. 快速检测技术在酱油发酵中微量乙醇含量测定的应用改进 [J]. 中国调味品, 2018, 43(4): 187-190.
- [66] 邓小文, 兰丽丽, 蒋小良, 等. 顶空-气相色谱法测定纸尿裤中环氧乙烷残留量 [J]. 中华纸业, 2017, 38(12): 25-27.
- [67] 邓明亮, 杨萍, 伏广伟. 乙酰丙酮比色法测定口罩中环氧乙烷的残留量 [J]. 中国纤检, 2017(6): 95-97.
- [68] 赵俊芳, 赵玉生, 姚二民. 超高压技术处理食品的特点 [J]. 食品科技, 2006(10): 11-13.
- [69] 王维琴, 王剑平. 高压脉冲电场在食品灭菌方面的应用 [J]. 农机化研究, 2004(1): 205-208.
- [70] 张军凯, 包青平, 陈权辉, 等. 食品加工新型杀菌技术研究进展 [J]. 食品安全质量检测学报, 2017, 8(8): 3099-3103.