

⁶⁰Co 辐照对抱龙丸中 4 种成分的影响

李艳萍¹, 曾煦欣¹, 张荣波¹, 谭 珍², 吴剑峰^{1*}

(1. 佛山科学技术学院医学院, 广东 佛山 528000; 2. 佛山冯了性药业有限公司, 广东 佛山 528000)

摘要: 目的 通过 HPLC 法研究⁶⁰Co 辐照对抱龙丸(厚朴、木香、茯苓等)中 4 种成分含有量的影响。方法 该药物甲醇提取液的分析采用 AgilentTC-C₁₈ 色谱柱(5 μm, 150 mm×4.6 mm); 流动相乙腈-水; 检测波长 294 nm(和厚朴酚与厚朴酚)和 225 nm(木香炔内酯与去氢木香内酯); 体积流量 1.0 mL/min; 进样量 20 μL; 柱温 25 ℃。所得数据用 SPSS 19.0 软件进行分析。结果 经⁶⁰Co 辐照(0、2、6、10 kGy)后, 和厚朴酚含有量分别为 1.77、1.74、1.76、1.76 mg/g, 厚朴酚分别为 2.36、2.35、2.36、2.34 mg/g, 木香炔内酯分别为 0.24、0.24、0.25、0.24 mg/g, 去氢木香内酯分别为 0.74、0.74、0.75、0.72 mg/g, 辐照前后均无显著性差异($P>0.05$)。结论 ⁶⁰Co 辐照对抱龙丸中和厚朴酚、厚朴酚、木香炔内酯及去氢木香内酯的含有量无明显影响。

关键词: 抱龙丸; 和厚朴酚; 厚朴酚; 木香炔内酯; 去氢木香内酯;⁶⁰Co 辐照; HPLC

中图分类号: R927.2

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2016)10-2184-04

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2016.10.018

Effects of ⁶⁰Co irradiation on four constituents in Baolong Pills

LI Yan-ping¹, ZENG Xu-xin¹, ZHANG Rong-bo¹, TAN Zhen², WU Jian-feng^{1*}

(1. Medical College, Foshan University, Foshan 528000, China; 2. Foshan Feng Liao Xing Pharmaceutical Co., Ltd., Foshan 528000, China)

ABSTRACT: AIM To study the effects of ⁶⁰Co irradiation on contents of four constituents in Baolong Pills (a medication to relieve digestive problems, containing *Magnoliae Officinalis Cortex*, *Aucklandiae Radix*, *Poria*, etc.) by HPLC. **METHODS** The analysis of methanol extract of this drug was performed on a 25 ℃ thermostatic AgilentTC-C₁₈ column (5 μm, 150 mm×4.6 mm), with the mobile phase comprising of acetonitrile-water flowing at a rate of 1.0 mL/min, the detection wavelengths were set at 294 nm for honokiol and magnolol, and 225 nm for costunolide and dehydrocostus lactone, and the injection volume was 20 μL. The obtained data were analyzed by SPSS 19.0 software. **RESULTS** Exposed to ⁶⁰Co irradiation at doses of 0, 2, 6 and 10 kGy, honokiol had its content variations of 1.77, 1.74, 1.76 and 1.76 mg/g, magnolol had its content changes to 2.36, 2.35, 2.36 and 2.34 mg/g, costunolide 0.24, 0.24, 0.25 and 0.24 mg/g, and dehydrocostus lactone 0.74, 0.74, 0.75 and 0.72 mg/g, respectively. There existed no significant differences before and after irradiation ($P>0.05$).

CONCLUSION ⁶⁰Co irradiation gives no obvious impact on the content changes of honokiol, magnolol, costunolide and dehydrocostus lactone in Baolong Pills.

KEY WORDS: Baolong Pills; honokiol; magnolol; costunolide; dehydrocostus lactone; ⁶⁰Co irradiation; HPLC

中成药原材料及制作工艺均较复杂, 生产过程中容易被细菌污染, 对药品的安全性有着极大的威胁。生产实践中常用的灭菌方法有热压灭菌、微波灭菌、⁶⁰Co-γ 射线灭菌等, 但由于中成药中多种有

效成分具有易挥发、热不稳定等性质, 高压、高热灭菌会对其质量会产生较大的影响^[1], 而⁶⁰Co-γ 射线灭菌法具有穿透力强、灭菌效果好、低廉、节能、常温、不破坏原包装、对大规模生产实用性高

收稿日期: 2015-10-12

基金项目: 佛山社会组织发展专项扶持基金项目(20140430); 佛山市医学类科技攻关项目(2014AB00260)

作者简介: 李艳萍(1985—), 女, 博士, 从事天然药物化学研究。Tel: (0757) 82836985, E-mail: lyfosu@126.com

* 通信作者: 吴剑峰(1960—), 女, 博士, 教授, 从事天然活性成分的研究与开发。Tel: (0757) 82836985, E-mail: jianfeng839@

等特点^[2],近年来得到越来越广泛的应用。研究表明,⁶⁰Co- γ 辐照灭菌对中成药的色、香、味及化学成分等方面影响较小^[3],但部分中药材经5 kGy剂量⁶⁰Co- γ 辐照后,所含化学成分有明显变化,如补骨脂、锦灯笼、明秦艽、乳香、天竺黄、珍珠、浙贝母、紫菀等^[4-5]。《中国药典》2010版规定,只有不受辐射破坏的原料药及成品才可用该方法灭菌,而且⁶⁰Co- γ 辐照灭菌前应验证所使用的剂量不影响被灭菌物品的安全性、有效性及稳定性^[6]。

抱龙丸是广东佛山地区传统中成药,由厚朴、木香、茯苓、陈皮、薄荷、紫苏叶、僵蚕、山药、天竺黄、檀香等药材组成,具有祛风化痰,健脾和胃之功效,主治脾胃不和、风热痰内蕴所致的腹泻^[7]。方中厚朴燥湿消痰,下气除满^[8];木香行气止痛,健脾消食,同时对哮喘和胃病也有功效^[9],两者皆为抱龙丸的重要组成成分。近年来,该药物通过⁶⁰Co- γ 辐照灭菌来有效控制微生物限量,但对其中有效成分是否因辐照而被破坏,生物活性是否发生改变等问题,至今尚未有定论,同时也缺少相关的评价标准。本实验拟通过HPLC法考察⁶⁰Co辐照对抱龙丸中和厚朴酚、厚朴酚、木香烃内酯及去氢木香内酯含有量的影响,为实际生产灭菌提供一定的参考。

1 仪器与材料

Agilent 1260 高效液相色谱仪,配置 Agilent 1260MWD 检测器、Agilent TC-C₁₈ 色谱柱(5 μ m, 150 mm \times 4.6 mm); BS-110S 电子分析天平(德国赛多利斯公司); AS5150 超声清洗器; LD4-2A 低速离心机; 移液枪(上海求精生化试剂仪器有限公司); ZTLH00005 纯水系统。厚朴酚(批号 110729-200412)、和厚朴酚(批号 110730-201112)、木香烃内酯(批号 111524-201208)、去氢木香内酯(批号 111525-201209)对照品均购自中国食品药品检定研究院。抱龙丸由佛山冯了性药业有限公司提供。乙腈为色谱纯;水为超纯水;其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液制备 精密称取和厚朴酚、厚朴酚、木香烃内酯、去氢木香内酯对照品适量,甲醇溶解并分别稀释至 1 250、850、170、633 μ g/mL,按 1:1:1:1 比例混合,即得,避光低温保存。

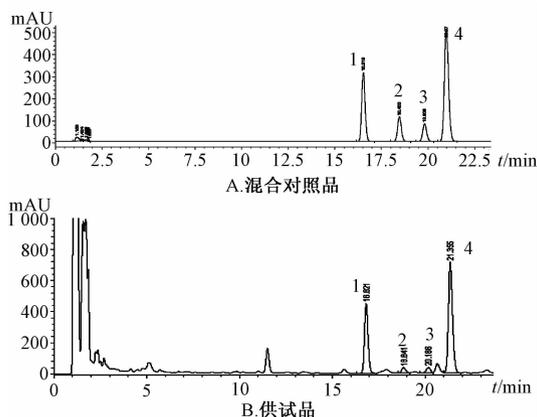
2.2 供试品制备 供试品的辐照工作由佛山冯了性药业有限公司完成。世界卫生组织认为,10 kGy 及以下剂量对食品的辐照无需作毒理试验,故高剂

量选择 10 kGy。本实验选择 2、6、10 kGy 3 个辐照剂量,对抱龙丸粉末(过 3 号筛)进行辐照,不经辐照处理的粉末作为空白(0 kGy)。

精密称取上述供试品粉末 4 g,置于具塞锥形瓶中,精密加入甲醇 25 mL,遮光密塞,称定质量,超声提取 30 min,放冷,甲醇补足减失的质量,摇匀,1 000 r/min 离心 10 min,取上清液,微孔滤膜滤过,取续滤液,即得,避光低温保存。

2.3 色谱条件 Agilent TC-C₁₈ 色谱柱(5 μ m, 150 mm \times 4.6 mm);流动相乙腈-水(0~30 min, 40:60~63:37);检测波长 294 nm(和厚朴酚与厚朴酚)和 225 nm(木香烃内酯与去氢木香内酯);体积流量 1.0 mL/min;进样量 20 μ L;柱温 25 $^{\circ}$ C。

2.4 专属性试验 取混合对照品、供试品(0 kGy)溶液适量,在“2.3”项色谱条件下进行分析,色谱图见图 1,可见和厚朴酚、厚朴酚、木香烃内酯和去氢木香内酯的峰型均较对称,供试品与对照品出峰时间一致,分离效果均较理想。



1. 和厚朴酚 2. 木香烃内酯 3. 去氢木香内酯 4. 厚朴酚
1. honkiol 2. costunolide 3. dehydrocostus lactone 4. magnolo

图 1 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms

2.5 系统适应性试验 在“2.3”项色谱条件下,分别对混合对照品、供试品(0 kGy)溶液进行系统适应性考察。结果,供试品与对照品中厚朴酚、和厚朴酚、木香烃内酯和去氢木香内酯的保留时间一致,对称因子、理论塔板数和分离度均达到定量检测限要求。

2.6 线性关系考察 取“2.1”项下对照品溶液,甲醇稀释,得到 6 组不同质量浓度的溶液,在“2.3”项色谱条件下,以峰面积(y)对质量浓度

(x) 进行回归, 得线性方程分别为和厚朴酚 $y = 31.632x + 253.31$ ($R^2 = 0.9995$)、厚朴酚 $y = 29.171x + 1058.1$ ($R^2 = 0.9995$)、木香炔内酯 $y = 50.83x + 65.24$ ($R^2 = 0.9999$)、去氢木香内酯 $y = 21.389x + 114.49$ ($R^2 = 0.9991$), 分别在 9.766 ~ 1250、26.5625 ~ 850、1.329 ~ 170、19.79 ~ 633.33 $\mu\text{g/mL}$ 范围内呈良好的线性关系。

2.7 精密度试验 取“2.2”项下供试品(0 kGy)溶液1份, 在“2.3”项色谱条件下连续进样6次, 测得和厚朴酚、厚朴酚、木香炔内酯和去氢木香内酯峰面积 RSD 分别为 1.74%、1.63%、1.85% 和 1.24%, 表明仪器精密度良好。

2.8 稳定性试验 取“2.2”项下供试品(0 kGy)溶液1份, 于 0、2、4、8、12、24 h 进样, 在“2.3”项色谱条件下测定, 测得和厚朴酚、厚朴酚、木香炔内酯和去氢木香内酯峰面积 RSD 分别为 0.78%、0.72%、1.72% 和 1.39%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.9 加样回收率试验 精密量取含有量已知的供试品(0 kGy)溶液9份, 每份 2 mL, 精密加入含有量已知的和厚朴酚(1318 $\mu\text{g/mL}$)、厚朴酚(1599 $\mu\text{g/mL}$)、木香炔内酯(165 $\mu\text{g/mL}$)和去氢木香内酯(489 $\mu\text{g/mL}$)对照品溶液适量(分别约相当于供试品中和厚朴酚、厚朴酚、木香炔内酯和去氢木香内酯含有量的 80%、100% 和 120%), 补足体积至 5 mL, 在“2.3”项色谱条件下测定, 计算回收率, 结果见表 1。

2.10 含有量测定 将“2.2”项下供试品溶液在“2.3”项色谱条件下检测, 测定峰面积, 平行 3 次, 按“2.6”项下标准曲线方程测定含有量, 结果见表 2。

2.11 统计学分析 采用 SPSS19.0 软件中的单因素分析(One-way ANOVA), 对表 2 数据进行分析, 结果见表 3。由表可知, 组间差异均无统计学意义($P > 0.05$), 即 ^{60}Co 辐照灭菌不影响抱龙丸中这 4 种有效成分的含有量。

3 讨论

3.1 指标成分的选择 为了研究的全面性, 本实验考察 ^{60}Co 辐照对抱龙丸有效成分的影响, 除了选取厚朴酚(2010版《中国药典》规定)外, 还选取了和厚朴酚、木香炔内酯和去氢木香内酯。由于厚朴与木香都是抱龙丸药理活性的主要来源, 故对以上 4 种成分进行研究具有更大的意义。

表 1 加样回收率试验结果 ($n=9$)

Tab. 1 Results of recovery tests ($n=9$)

成分	原有量/ mg	加入量/ mg	测得量/ mg	回收率/ %	平均回 收率/%	RSD/ %
和厚朴酚	0.5264	0.6326	1.1406	97.09	100.99	2.61
	0.5264	0.5272	1.0465	98.65		
	0.5264	0.4086	0.9423	101.79		
	0.5246	0.6330	1.1784	103.28		
	0.5246	0.5221	1.0734	105.11		
	0.5246	0.4123	0.9503	103.25		
	0.5427	0.6458	1.1784	98.44		
	0.5427	0.5404	1.0854	100.43		
	0.5427	0.4349	0.9813	100.85		
厚朴酚	0.6283	0.7515	1.3891	101.24	100.57	2.34
	0.6283	0.6236	1.2466	99.15		
	0.6283	0.4957	1.1441	104.05		
	0.6253	0.7499	1.3480	96.37		
	0.6253	0.6230	1.2424	99.05		
	0.6253	0.4912	1.1222	101.16		
	0.6856	0.8155	1.5132	101.48		
	0.6856	0.6876	1.3956	103.26		
	0.6856	0.5437	1.2257	99.34		
木香炔 内酯	0.0812	0.0974	0.1772	98.56	99.99	2.74
	0.0812	0.0809	0.1641	102.47		
	0.0812	0.0644	0.1423	94.88		
	0.0805	0.0958	0.1792	103.03		
	0.0805	0.0799	0.1591	98.33		
	0.0805	0.0635	0.1463	103.60		
	0.0889	0.0743	0.1633	100.13		
	0.0889	0.0611	0.1497	99.51		
	0.0889	0.0495	0.1381	99.39		
去氢木香 内酯	0.2140	0.2592	0.4800	102.62	100.32	2.67
	0.2140	0.2152	0.4399	104.97		
	0.2140	0.1712	0.3845	99.59		
	0.2124	0.2934	0.4994	97.82		
	0.2124	0.2445	0.4511	97.63		
	0.2124	0.1956	0.4063	99.13		
	0.2237	0.2690	0.5010	103.09		
0.2237	0.2249	0.4432	97.60			
0.2237	0.1809	0.4053	100.39			

表 2 含有量测定结果 ($n=3$)

Tab. 2 Results of content determination ($n=3$)

^{60}Co 辐照 剂量/kGy	和厚朴酚/ ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)	厚朴酚/ ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)	木香炔内酯/ ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)	去氢木香内酯/ ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)
0	1.77	2.36	0.24	0.74
2	1.74	2.35	0.24	0.74
6	1.76	2.36	0.25	0.75
10	1.76	2.34	0.24	0.72

表3 单因素分析结果

Tab. 3 Results of One-way ANOVA

成分	平方和	自由度	均方	F值	P值
和厚朴酚	0.001	3	0.000	0.876	0.493
厚朴酚	0.001	3	0.000	1.072	0.414
木香烃内酯	0.000	3	0.000	0.244	0.864
去氢木香内酯	0.002	3	0.001	1.463	0.296

3.2 实验条件 考虑到溶剂效应,本实验曾将供试品用甲醇提取后挥干,再用等量乙腈溶解,发现4种成分的色谱参数与直接用甲醇溶解时几乎一样。为了准确比较各辐照组的差别,防止引入不必要的实验误差,故供试品用甲醇提取后直接进样检测。

前期有人应用HPLC法同时检测抱龙丸中厚朴酚与和厚朴酚的含有量^[10],以及同时检测木香烃内酯与去氢木香内酯的含有量^[11],但尚无同时检测以上4种成分的报道。参考文献[10-15],本实验首先尝试用甲醇-水进行梯度洗脱,发现4种成分的分离效果不佳,再改用乙腈-水,最后获得稳定理想的分离条件,为其含有量的测定提供保证。

由于木香烃内酯与去氢木香内酯皆为酯类成分,见光易分解,故配制溶液时采用棕色量瓶,实验过程采取避光措施,并密封避光冷藏保存。

4 结论

本实验采用HPLC法考察⁶⁰Co辐照对抱龙丸中和厚朴酚、厚朴酚、木香烃内酯与去氢木香内酯含有量的影响,发现不同⁶⁰Co辐照剂量(0、2、6、10 kGy)对其均无明显影响,可将为该药物采用⁶⁰Co辐照灭菌提供一定参考。

参考文献:

[1] 刘芳芳,白志宇,曲婷丽,等.比较钴-60辐照灭菌与高

温灭菌对四神丸主要成分的影响[J].中华中医药学刊,2010,28(5):1102-1104.

[2] 谢正福,王 森.浅谈辐射灭菌在中药生产中的应用及相关问题[J].海峡药学,2010,22(7):261-263.

[3] 陈金月.60钴-γ射线辐照灭菌对大黄主要成分的影响[J].时珍国药研究,1996,7(3):154-155.

[4] 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.

[5] 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.

[6] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:2010年版一部[S].北京:中国医药科技出版社,2010:805.

[7] 洪文旭,苏 礼.抱龙丸(《和剂局方》)[J].上海中医药杂志,1984(9):23.

[8] 吴经耀,陈素红,吕圭源.厚朴归脾、胃、肺经及相关药理作用研究进展[J].亚太传统医药,2011,7(2):148-150.

[9] 魏 华,彭 勇,马国需,等.木香有效成分及药理作用研究进展[J].中草药,2012,43(3):613-620.

[10] 李 慧,陈宝田,刘 莉.HPLC法测定抱龙丸中厚朴酚及和厚朴酚的含量[J].浙江中医药大学学报,2008,32(6):808-811.

[11] 李 慧,陈宝田,刘 莉,等.HPLC法测定抱龙丸中木香烃内酯及去氢木香内酯的含量[J].中国实验方剂学杂志,2008,14(12):7-8.

[12] 赵 霞,袁梦婕.高效液相色谱法测定加味藿香正气丸中厚朴酚与和厚朴酚的含量[J].现代医药卫生,2014,30(4):499-500,502.

[13] 裴学军,芦金清,刘 毅,等.厚朴药材高效液相指纹谱实验研究[J].中药材,2002,25(9):631-634.

[14] 孟 超,吴 丰,马 林.厚朴类中药厚朴酚及和厚朴酚含量测定[J].天然产物研究与开发,2007,19(6):1024-1026.

[15] 贾晓斌,王丽静,陈 彦,等.HPLC测定肉桂、木香中桂皮醛、木香烃内酯和去氢木香内酯[J].中成药,2010,32(3):459-462.