

· 实验研究 ·

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2019.20.006

$^{60}\text{Co}-\gamma$ 辐照对丹香清脂颗粒中 5 种有效成分含量的影响

康江丽, 吴雯

(中国人民解放军联勤保障部队第 900 医院, 福建 福州 350000)

摘要:目的 探讨 $^{60}\text{Co}-\gamma$ 辐照对丹香清脂颗粒中 5 种有效成分含量的影响。方法 采用高效液相色谱法测定含量, 色谱柱为 Agilent Zorbax-C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-0.5% 磷酸溶液(梯度洗脱), 流速为 1.0 mL/min, 检测波长为 280 nm (0~39 min)、268 nm(40~50 min), 柱温为 30℃。以 2, 5, 8 kGy 剂量 $^{60}\text{Co}-\gamma$ 辐照丹香清脂颗粒, 比较辐照前后 5 种有效成分含量的变化。结果 丹参酮 II_A、丹酚酸 B、蒙本内酯、洋川芎内酯 A 和洋川芎内酯 I 进样量分别在 0.122 4~3.061 μg、0.151 2~3.781 μg、0.065 4~1.463 μg、0.059 6~1.491 μg、0.041 3~1.032 μg 范围内与峰面积线性关系良好, 精密度、稳定性、重复性试验结果的 RSD 均小于 2%, 平均加样回收率分别为 100.10%, 100.30%, 99.50%, 99.17%, 99.34%, RSD 分别为 0.59%, 0.87%, 0.66%, 0.71%, 1.23% (n=6); 与辐照前比较, 经 8 kGy 剂量辐照后丹香清脂颗粒中蒙本内酯、洋川芎内酯 A 及洋川芎内酯 I 含量显著减少 (P<0.05)。结论 辐照剂量不超过 5 kGy 时, 丹香清脂颗粒中 5 种有效成分含量变化不大。

关键词:丹香清脂颗粒; $^{60}\text{Co}-\gamma$ 辐照; 丹参酮 II_A; 丹酚酸 B; 蒙本内酯; 洋川芎内酯 A; 洋川芎内酯 I; 含量测定

中图分类号: R932; R284.2; R286.0

文献标识码: A

文章编号: 1006-4931(2019)20-0017-04

Effect of $^{60}\text{Co}-\gamma$ Irradiation on 5 Active Ingredients in Danxiang Qingzhi Granules

KANG Jiangli, WU Wen

(The 900th Hospital of the Joint Logistics Support Force of the Chinese People's Liberation Army, Fuzhou, Fujian, China 350000)

Abstract: Objective To investigate the effect of $^{60}\text{Co}-\gamma$ irradiation on 5 active ingredients in Danxiang Qingzhi Granules. **Methods** The content was determined by HPLC method. The chromatographic column was Agilent Zorbax-C₁₈ column(250 mm×4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was acetonitrile-0.5% phosphoric acid solution (gradient elution), the flow rate was 1.0 mL/min, the detection wavelength was set at 280 nm(0~39 min) and 268 nm(40~50 min) and the column temperature was 30℃. Danxiang Qingzhi Granules were irradiated with $^{60}\text{Co}-\gamma$ at dose of 2, 5 and 8 kGy, and the contents of five active ingredients before and after irradiation were compared. **Results** The linear range of tanshinone II_A, salvianolic acid B, ligustilide, senkyunolide A and senkyunolide I were 0.122 4~3.061 μg, 0.151 2~3.781 μg, 0.065 4~1.463 μg, 0.059 6~1.491 μg and 0.041 3~1.032 μg. The RSDs of precision, stability and repeatability tests were less than 2%. The average recoveries were 100.10%, 100.30%, 99.50%, 99.17% and 99.34%, respectively. RSDs were 0.59%, 0.87%, 0.66%, 0.71% and 1.23% (n=6), respectively. Compared with those before irradiation, the contents of ligustilide, senkyunolide A and senkyunolide I in Danxiang Qingzhi Granules were significantly decreased after 8 kGy of irradiation (P<0.05). **Conclusion** When the irradiation dose is not more than 5 kGy, the changes of five active ingredients in Danxiang Qingzhi Granules are not significant.

Key words: Danxiang Qingzhi Granules; $^{60}\text{Co}-\gamma$; tanshinone II_A; salvianolic acid B; ligustilide; senkyunolide A; senkyunolide I; content determination

丹香清脂颗粒是由丹参、川芎、桃仁、降香、大黄等 8 味中药材组方的中药复方制剂, 属国家基本药物, 收载于 2015 年版《中国药典(一部)》, 有活血化瘀、行气通络功效, 临床主要用于治疗高血脂血症属气滞血瘀证者^[1]。丹参和川芎为方中君药, 有活血、化瘀、活络功效, 丹参主

要成分有丹参酮 II_A 和丹酚酸 B^[2-3], 川芎主要成分为蒙本内酯、洋川芎内酯 A 和洋川芎内酯 I 等^[4-5]。该颗粒现行法定标准中仅有川芎、大黄和莪术的薄层色谱鉴别项及丹参酮 II_A 的含量测定项, 用于其质量控制稍显不足。

丹香清脂颗粒制作工艺复杂, 为保证制剂成品质

第一作者: 康江丽, 女, 大学本科, 药师, 研究方向为药品质量标准, (电子信箱)315669592@qq.com。

- [8] ZHOU F, ZHOU L, GUO T, et al. Plasma proteomics reveals coagulation, inflammation, and metabolic shifts in H-type hypertension patients with and without acute ischemic stroke[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(59):100384-100395.
- [9] 顾明霞, 王春宁, 张英强, 等. 叶酸和维生素 B₆/B₁₂ 联合使用对老年 H 型高血压病人心功能的影响[J]. *实用老年医学*, 2017, 31(10):934-937.
- [10] 赵宝华, 张硕锐, 李长明, 等. 叶酸辅助治疗对 H 型高血压患者同型半胱氨酸水平及脑卒中发病率的影响[J]. *中国药业*, 2018, 27(5):39-41.
- [11] 罗羽慧, 梅霞, 柳亚敏, 等. 马来酸依那普利叶酸片对伴有 H 型高血压的不稳定型心绞痛患者血清炎症因子及心功能的影响[J]. *重庆医学*, 2018, 47(19):2560-2563.

(收稿日期: 2019-02-24)

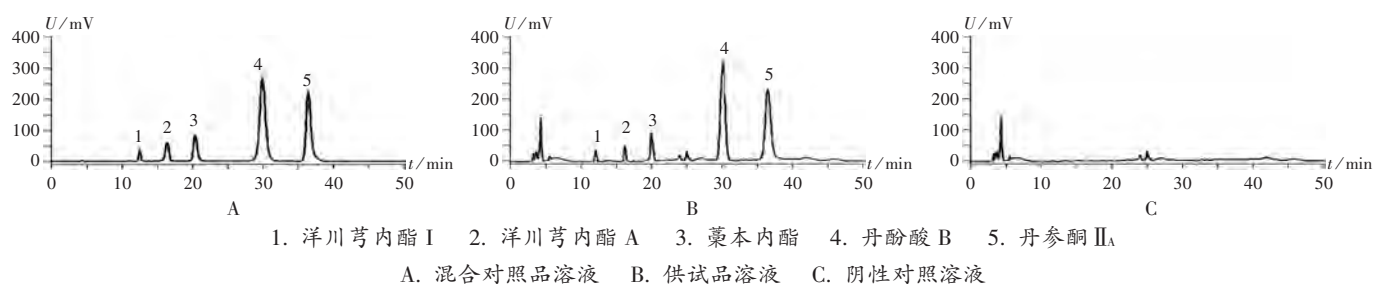


图1 高效液相色谱图

量,避免在加工和储存过程中受到细菌污染,须采取灭菌措施。⁶⁰Co- γ 辐照灭菌法是以 γ 射线电离辐射产生的高能射线,通过物理和生物效应,破坏细菌中蛋白质的合成,从而达到杀菌效果,穿透力强、操作简单、灭菌效果好,可在常温下进行^[6-7]。本研究采用 ⁶⁰Co- γ 辐照丹香清脂颗粒进行灭菌,并建立高效液相色谱(HPLC)法同时测定丹香清脂颗粒中丹参酮 II_A、丹酚酸 B、藁本内酯、洋川芎内酯 A 和洋川芎内酯 I 的含量,分别考察 2, 5, 8 kGy 3 个辐照剂量对上述成分含量的影响,确定最佳有效辐照强度,为丹香清脂颗粒生产工艺中的灭菌提供参考。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

1260 型高效液相色谱仪,包括 G1311A 四元梯度泵、G1329A 自动进样器、G1314B-DAD 检测器、G1316A 柱温箱、Agilent-Chemstation 数据处理系统(美国 Agilent 公司);AUW-220D 型电子分析天平(日本 Shimadzu 公司);中药粉碎机(浙江屹立工贸有限公司);⁶⁰Co- γ 辐照装置(深圳市金鹏源辐照技术有限公司);KQ-250DB 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);LRH-150B 型生化培养箱(广东省医疗器械厂);ZOZ-AB 型电热恒温干燥箱(上海跃进医疗器械厂);YJ-875 型医用净化工作台(苏州净化设备厂)。

1.2 试剂

丹香清脂颗粒(吉林敖东集团大连药业股份有限公司,批号分别为 170915, 171209, 180123, 180217, 180321, 180511, 180622, 规格为每袋 10 g);丹参酮 II_A 对照品(批号为 110766-201721, 含量 99.5%);丹酚酸 B 对照品(批号为 111562-201716, 含量 94.1%);藁本内酯对照品(批号为 111737-201608, 含量 100.0%),均购于中国食品药品检定研究院;洋川芎内酯 A 对照品(批号为 62006-39-7, 含量 97.2%),洋川芎内酯 I 对照品(批号为 94596-29-5, 含量 97.5%),均购于上海纯优生物科技有限公司;甲醇、乙腈均为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为超纯水。

2 方法

2.1 色谱条件

色谱柱: Agilent Zorbax-C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm,

5 μ m);流动相:乙腈(A)-0.5% 磷酸溶液(B),梯度洗脱(0~10 min 时 42% A, 10~25 min 时 42% A→68% A, 25~40 min 时 68% A→88% A, 40~50 min 时 88% A→42% A);流速:1.0 mL/min;检测波长:280 nm(0~39 min), 268 nm(40~50 min);柱温:30 $^{\circ}$ C^[8-9]。

2.2 溶液制备

混合对照品溶液:分别称取各待测成分对照品适量,精密称定,分别加 80% 甲醇制成每 1 mL 含丹参酮 II_A 1.224 4 mg、丹酚酸 B 1.512 5 mg、藁本内酯 0.653 7 mg、洋川芎内酯 A 0.596 3 mg、洋川芎内酯 I 0.412 7 mg 的混合对照品溶液,摇匀,低温避光贮存。

供试品溶液:取装量差异项下样品,研匀,取约 2.5 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入 80% 甲醇 50 mL,密塞,称定质量,超声处理(功率 500 W, 频率 40 kHz) 45 min,放冷,再称定质量,用 80% 甲醇补足减失的质量,经 0.45 μ m 微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

阴性对照溶液:按丹香清脂颗粒处方和工艺制备缺丹参、川芎的阴性样品,按供试品溶液制备方法制备阴性对照溶液。

2.3 方法学考察

系统适用性试验:取上述混合对照品溶液、供试品溶液各适量,按拟订色谱条件进样测定,记录色谱图,详见图 1。理论板数按各待测成分峰计均大于 3 000,分离度均大于 1.5,基线分离良好。

线性关系考察:精密量取混合对照品溶液 5 mL,置 50 mL 容量瓶中,加 80% 甲醇定容,精密量取 1, 2, 5, 10, 15, 20, 25 μ L,按拟订色谱条件进样测定,记录峰面积。以待测成分进样量(X , μ g)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程与线性范围。详见表 1。

表 1 回归方程、线性范围及定量限($n=7$)

待测成分	回归方程	r	线性范围(μ g)	定量限(ng)
丹参酮 II _A	$Y=5.886X+1.527$	0.999 8	0.122 4~3.061	0.25
丹酚酸 B	$Y=10.46X-2.634$	0.999 7	0.151 2~3.781	0.42
藁本内酯	$Y=3.231X+1.121$	0.999 6	0.065 4~1.463	0.11
洋川芎内酯 A	$Y=6.193X-3.031$	0.999 5	0.059 6~1.491	0.08
洋川芎内酯 I	$Y=2.212X+1.132$	0.999 5	0.041 3~1.032	0.05

定量限考察:分别精密量取混合对照品溶液适量, 倍比稀释, 按拟订色谱条件进样测定, 以信噪比(S/N) 10:1 计算定量限。结果见表1。

精密度试验:取混合对照品溶液适量, 按拟订色谱条件连续进样测定6次, 记录峰面积。结果丹参酮Ⅱ_A、丹酚酸B、藁本内酯、洋川芎内酯A和洋川芎内酯I峰面积的RSD分别为1.21%, 1.03%, 1.12%, 0.82%, 0.89% ($n=6$), 表明仪器精密度良好。

稳定性试验:取供试品(批号为180321)溶液适量, 分别于室温下放置0, 3, 6, 9, 12, 18, 24 h时按拟订色谱条件进样测定, 记录峰面积。结果丹参酮Ⅱ_A、丹酚酸B、藁本内酯、洋川芎内酯A和洋川芎内酯I峰面积的RSD分别为1.13%, 0.90%, 1.02%, 0.83%, 0.71% ($n=7$), 表明供试品溶液室温放置24 h内基本稳定。

重复性试验:精密称取样品(批号为180321)6份, 依法制备供试品溶液, 再按拟订色谱条件进样测定, 记录峰面积并计算含量。结果丹参酮Ⅱ_A、丹酚酸B、藁本内酯、洋川芎内酯A和洋川芎内酯I平均含量分别为1.104 8, 1.362 2, 0.241 3, 0.192 7, 0.103 5 mg/g, RSD分别为1.31%, 1.01%, 1.10%, 0.84%, 0.91% ($n=6$), 表明方法重复性良好。

加样回收试验:取已知含量的样品(批号为180321)适量, 共6份, 分别加入低、中、高质量浓度的待测成分对照品溶液, 依法制备供试品溶液, 再按拟订色谱条件进样测定, 记录峰面积并计算回收率。结果见表2。

2.4 样品含量测定

取7批样品各适量, 分别以2, 5, 8 kGy 剂量⁶⁰Co- γ 辐照, 依法制备供试品溶液, 再按拟订色谱条件进样测定, 平行3次, 记录峰面积并计算样品含量。数据以SPSS 19.0 统计学软件分析, 行 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。结果见表3。

3 讨论

藁本内酯、洋川芎内酯A和洋川芎内酯I属苯酐类成分, 易受氧化、水解、光解、异构化等影响发生结构改变。藁本内酯的化学结构为不饱和的苯酐结构, 3位上有活泼的丁烯基, 均为化学不稳定性因素^[10]; 洋川芎内酯A含有的不饱和环易通过脱氢反应形成更加稳定的苯环结构^[11]。

本试验中取供试品溶液及各对照品溶液进行全波长扫描, 结果显示, 丹参酮Ⅱ_A、丹酚酸B在268 nm波长处有最大吸收, 藁本内酯、川芎内酯A和川芎内酯I在280 nm波长处有最大吸收, 故选择2个波长进行测定。在流动相的选择中, 分别尝试了乙腈-水、甲醇-水、乙腈-冰醋酸溶液、乙腈-磷酸溶液4种不同体系。最后发现, 以乙腈-0.5%磷酸溶液为流动相进行梯度洗脱

表2 加样回收试验结果($n=6$)

待测成分	取样量 (g)	样品含量 (mg)	加入量 (mg)	测得量 (mg)	回收率 (%)	$\bar{X}$ (%)	RSD (%)
丹参酮Ⅱ _A	1.011 5	1.117 5	1.480 3	2.600 1	100.16	100.10	0.59
	1.012 3	1.118 4	1.480 3	2.610 8	100.82		
	1.253 6	1.384 9	1.480 3	2.859 7	99.63		
	1.250 7	1.381 8	1.480 3	2.859 9	99.85		
	1.551 9	1.714 5	1.480 3	3.185 5	99.37		
	1.551 7	1.714 3	1.480 3	3.205 9	100.76		
丹酚酸B	1.011 5	1.377 8	1.499 2	2.867 4	99.36	100.30	0.87
	1.012 3	1.378 9	1.499 2	2.873 2	99.67		
	1.253 6	1.707 7	1.499 2	3.206 8	99.99		
	1.250 7	1.703 7	1.499 2	3.203 8	100.06		
	1.551 9	2.114 0	1.499 2	3.631 3	101.21		
	1.551 7	2.113 7	1.499 2	3.635 9	101.53		
藁本内酯	1.011 5	0.244 1	0.338 4	0.578 7	98.88	99.50	0.66
	1.012 3	0.244 3	0.338 4	0.580 4	99.32		
	1.253 6	0.302 5	0.338 4	0.636 3	98.64		
	1.250 7	0.301 8	0.338 4	0.641 2	100.30		
	1.551 9	0.374 5	0.338 4	0.712 8	99.97		
	1.551 7	0.374 4	0.338 4	0.712 4	99.88		
洋川芎内酯A	1.011 5	0.194 9	0.252 4	0.442 9	98.25	99.17	0.71
	1.012 3	0.195 1	0.252 4	0.444 0	98.61		
	1.253 6	0.241 6	0.252 4	0.491 9	99.17		
	1.250 7	0.241 0	0.252 4	0.491 1	99.09		
	1.551 9	0.299 1	0.252 4	0.551 4	99.96		
	1.551 7	0.299 0	0.252 4	0.551 3	99.96		
洋川芎内酯I	1.011 5	0.104 7	0.151 1	0.253 1	98.21	99.34	1.23
	1.012 3	0.104 8	0.151 1	0.257 9	101.32		
	1.253 6	0.129 7	0.151 1	0.280 8	100.00		
	1.250 7	0.129 4	0.151 1	0.279 9	99.60		
	1.551 9	0.160 6	0.151 1	0.309 2	98.35		
	1.551 7	0.160 6	0.151 1	0.309 5	98.54		

时, 各色谱峰之间分离良好, 杂质峰无干扰。提取方法考察了回流提取、超声提取, 考虑到超声提取简单方便且提取完全, 故选用超声提取法, 并通过比较不同提取溶剂体积及不同提取时间下超声提取法对5种成分的提取率, 最终确定为用80%甲醇作溶剂超声提取45 min。

本试验中通过考察⁶⁰Co- γ 辐照对丹香清脂颗粒中5种有效成分含量的影响, 发现辐照剂量控制在不超过5 kGy时, 能对丹香清脂颗粒进行有效消毒灭菌, 同时不影响制剂质量。该结论可为对该类药物进行⁶⁰Co- γ 辐照灭菌提供参考。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 678.
- [2] 王素萍, 徐克明. 丹参有效成分抗心肌组织纤维化作用研究进展[J]. 中国药业, 2014, 23(13): 115-116.