

中图分类号: R917; R932 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2023)16-0090-04
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2023.16.021



电子束辐照对肉豆蔻药材质量及灭菌效果的影响*

戈雅倩^{1,2,3}, 谢和兵^{1,2,3,4△}, 尼玛次仁^{3,4}, 白玛旦增^{3,4}

(1. 安徽中医药大学药学院, 安徽 合肥 230012; 2. 江苏省南通市海门长三角药物高等研究院, 江苏 南通 226133;
3. 江苏神猴医药研究有限公司, 江苏 南通 226133; 4. 西藏神猴药业有限责任公司, 西藏 日喀则 857000)

摘要:目的 探讨电子束辐照对肉豆蔻药材质量及灭菌效果的影响。方法 采用电子加速器对肉豆蔻药材粉末样品进行电子束辐照灭菌, 辐照剂量分别为 0, 2, 4, 6, 8, 10 kGy。比较辐照前后样品的高效液相色谱(HPLC)图(并进行相似度评价), 以及去氢二异丁香酚、总黄酮含量, 细菌、霉菌和酵母菌、大肠菌群总数的变化。结果 不同剂量电子束辐照样品的 HPLC 图相似度均不低于 0.998。与空白对照样品(0 kGy)比较, 不同剂量电子束辐照样品去氢二异丁香酚和总黄酮含量变化不显著($P > 0.05$)。样品在辐照前后均未检出大肠菌群; 随着辐照剂量的增加, 细菌、霉菌和酵母菌总数均显著降低($P < 0.05$), 当辐照剂量为 8 kGy 时, 微生物总数符合 2020 年版《中国药典》规定, 当辐照剂量为 10 kGy 时, 细菌、霉菌和酵母菌均未检出。结论 不同剂量的电子束辐照灭菌对肉豆蔻药材质量无显著影响, 且辐照剂量为 8 kGy 时灭菌效果良好。

关键词: 肉豆蔻; 高效液相色谱法; 含量测定; 微生物限度检查

Influence of Electron Beam Irradiation on the Quality of Myristicae Semen and Sterilization Effect

GE Yaqian^{1,2,3}, XIE Hebing^{1,2,3,4}, NIMA Ciren^{3,4}, BAIMA Danzeng^{3,4}

(1. School of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei, Anhui, China 230012; 2. Yangtze Delta Drug Advanced Research Institute, Nantong, Jiangsu, China 226133; 3. Jiangsu Shenhou Pharmaceutical Research Co., Ltd., Nantong, Jiangsu, China 226133; 4. Tibet Shenhou Pharmaceutical Co., Ltd., Shigatse, Tibet, China 857000)

Abstract: Objective To investigate the influence of electron beam irradiation on the quality of Myristicae Semen and sterilization effect. **Methods** Electron accelerator was used to sterilize Myristicae Semen powder samples by the electron beam irradiation, with the irradiation doses of 0, 2, 4, 6, 8, 10 kGy, respectively. The changes of high-performance liquid chromatography (HPLC) chromatograms of the samples (similarity evaluation was performed in the study), the contents of dehydrodiisoeugenol, total flavonoids, the total count of bacteria, molds, yeasts and coliforms before and after irradiation were compared. **Results** The similarity of HPLC chromatograms of samples irradiated by different doses of electron beams was not lower than 0.998. Compared with those in the blank reference sample (0 kGy), there was no significant change in the contents of dehydrodiisoeugenol and total flavonoids in the samples irradiated by different doses of electron beams ($P > 0.05$). No coliform was detected in the samples before and after irradiation. As the irradiation dose increased, the total count of bacteria, molds and yeasts significantly decreased ($P < 0.05$). When the irradiation dose was 8 kGy, the total count of microorganisms met the requirements of the Chinese Pharmacopoeia (2020 Edition), and when the irradiation dose was 10 kGy, no bacterium, mold and yeast was detected in the samples. **Conclusion** Different doses of electron beam irradiation have no significant influence on the quality of Myristicae Semen, and the sterilization effect is good when the irradiation dose is 8 kGy.

Key words: Myristicae Semen; HPLC; content determination; microbial limit test

肉豆蔻是肉豆蔻科植物肉豆蔻 *Myristica fragrans* Houtt. 的干燥种仁, 广泛栽培于热带地区, 国内主要分布于广东、云南等地, 香辛味浓烈, 有温中行气、涩肠止泻之效^[1-2]。有研究表明, 肉豆蔻富含黄酮类、挥发油、木脂素、苯丙素等有效成分^[3], 有抗癌^[4]、抗炎^[5-6]、抗心肌缺血^[7]、抗氧化^[8]、预防脑损伤^[9]等药理作用。去氢二异丁香酚是肉豆蔻的指标性化学成分。藏医药中, 肉豆蔻常以生粉入药用于治疗心血管疾病^[10], 但在其加

工过程中易出现变质、腐败等问题, 影响药品储存和用药安全^[11-12]。故采取适宜的灭菌工艺是中药产业化的重要部分^[13]。本研究中采用电子加速器对肉豆蔻样品进行不同剂量的电子束辐照, 通过比较样品辐照前后的高效液相色谱(HPLC)图、去氢二异丁香酚含量、总黄酮含量及微生物总数, 评价电子束对肉豆蔻药材的辐照效应, 为电子加速器辐照技术应用于肉豆蔻药材及含药材中成药的灭菌提供参考。现报道如下。

*基金项目: 西藏自治区科技厅区域科技协同创新专项项目[QYXTZX-RKZ2022-07]。

第一作者: 戈雅倩, 女, 硕士研究生, 研究方向为中药制剂工艺及质量标准, (电子信箱)yqge2020@163.com。

△通信作者: 谢和兵, 男, 博士, 高级工程师, 研究方向为高原医学与传统藏药的产业化开发, (电子信箱)76445044@qq.com。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Essentia LC-16型高效液相色谱仪(配有SPD-16型紫外检测器)、UV-1900i型紫外分光光度计,均购自日本Shimadzu公司;XSR205DU/AC型电子天平(美国Mettler Toledo公司,精度为0.01 mg);WMS-1037型生物光学显微镜(上海无陌光学仪器有限公司);UC-250DE型超声波清洗仪(上海精其仪器有限公司);TGL-16B型台式高速离心机(常州中捷实验仪器制造有限公司);DX-10/20型电子加速器(中广核戈瑞<深圳>科技有限公司)。

1.2 试药

去氢二异丁香酚对照品(批号为17838-201804,含量为98.6%),芦丁对照品(批号为100080-202012,含量为92.4%),均购自中国食品药品检定研究院;甲醇为色谱纯,其他试剂均为分析纯,水为娃哈哈纯净水。肉豆蔻药材(安徽援康中药饮片股份有限公司,批号为210501),经江苏神猴医药研究有限公司谢和兵高级工程师鉴定为正品,符合2020年版《中国药典》标准。

2 方法与结果

2.1 样品制备及辐照处理

取药材适量,打成细粉,过2号筛,分装于铝箔袋密封,每袋12 g,共30袋;采用电子加速器对样品进行辐照灭菌处理,辐照剂量分别为0,2,4,6,8,10 kGy,得到空白对照样品和5种辐照样品。

2.2 去氢二异丁香酚含量测定

色谱条件:色谱柱为Ultimate XB-C₁₈柱(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相为甲醇-水(75:25,V/V);流速为1.0 mL/min;检测波长为274 nm;柱温为30℃;进样量为10 μL。

溶液制备:取去氢二异丁香酚对照品适量,精密称定,用甲醇制成质量浓度为30 μg/mL的对照品溶液。取样品0.5 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇50 mL,称定质量,超声(功率250 W、频率40 kHz,下同)处理30 min,放冷,再次称定质量,用甲醇补足缺失的质量,滤过,取续滤液,即得供试品溶液。

精密度、稳定性、重复性试验:按相关要求方法进行学考察。结果精密度、稳定性、重复性试验的RSD均小于2.0%,表明仪器精密度良好,供试品溶液在室温放置12 h内基本稳定,方法重复性良好。

含量测定:取对照品溶液和供试品溶液各适量,按上述色谱条件进样测定,记录色谱图。理论板数按去氢二异丁香酚峰计应不低于3 000。按外标法计算去氢二异丁香酚的含量。结果,各辐照样品中去氢二异丁香酚含量与空白对照样品间的差异无统计学意义($P>0.05$)。详见表1。

表1 样品去氢二异丁香酚和总黄酮含量测定结果($\bar{X}\pm s,n=3$)

Tab. 1 Results of the content determination of dehydrodiisoeugenol and total flavonoids in the samples ($\bar{X}\pm s,n=3$)							
辐照剂量 (kGy)	去氢二异丁香酚				总黄酮		
	含量(mg/g)	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值		含量(mg/mL)	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
0	2.52±0.02				1.18±0.02		
2	2.53±0.00	-1.04	0.41		1.04±0.07	1.63	0.24
4	2.54±0.00	-3.02	0.10		1.22±0.02	-1.45	0.28
6	2.52±0.01	0.06	0.96		1.20±0.08	0.21	0.86
8	2.48±0.03	2.34	0.14		1.33±0.02	-2.22	0.16
10	2.48±0.01	3.61	0.07		1.28±0.04	-1.31	0.32

2.3 相似度评价

采用中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012版)处理色谱图,以空白对照样品色谱图为参照,经过多点校正、全谱峰匹配,生成对照图谱,并计算相似度。结果所有样品间相似度均不低于0.998,共识别37个共有峰,保留时间的RSD均小于2.0%。HPLC图见图1(R_1 为去氢二异丁香酚对照品, S_1-S_6 分别为0,2,4,6,8,10 kGy辐照剂量样品,表2同)。

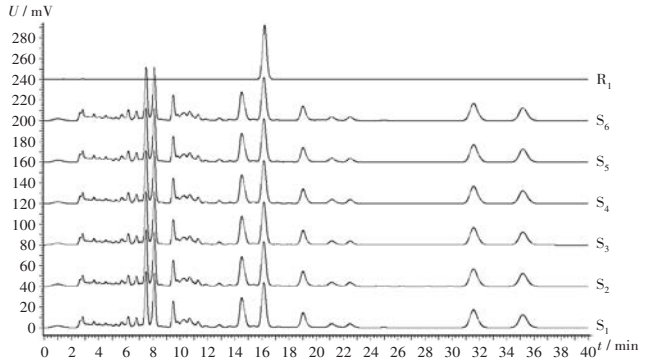


图1 高效液相色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms

表2 样品高效液相色谱图相似度评价

Tab. 2 Similarity evaluation of HPLC chromatograms of samples							
样品	S_1	S_2	S_3	S_4	S_5	S_6	R_1
S_1	1.000	0.998	0.999	0.999	1.000	1.000	1.000
S_2	0.998	1.000	0.998	0.998	0.998	0.998	0.999
S_3	0.999	0.998	1.000	1.000	0.999	0.999	1.000
S_4	0.999	0.998	1.000	1.000	1.000	0.999	1.000
S_5	1.000	0.998	0.999	1.000	1.000	1.000	1.000
S_6	1.000	0.998	0.999	0.999	1.000	1.000	1.000
R_1	1.000	0.999	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

2.4 总黄酮含量测定

供试品溶液制备:取样品约1.0 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,加入60%乙醇20 mL,称定质量,超声处理30 min,放冷,再次称定质量,用60%乙醇补足缺失的质量,摇匀,4 000 r/min离心5 min,取上清液,即得。

线性关系考察:取芦丁对照品0.010 88 g,精密称

定,置50 mL容量瓶中,加60%乙醇定容,得质量浓度为0.201 mg/mL的对照品贮备液;分别精密吸取0.5,1.0,1.5,2.0,2.5 mL置10 mL容量瓶中,依次加入5%亚硝酸钠溶液0.3 mL、10%氯化铝溶液0.3 mL、4%氢氧化钠溶液4 mL,摇匀,静置6 min,加水定容,摇匀,静置15 min。以不加对照品的空白试剂为对照,于510 nm波长处测定吸光度。以待测成分质量浓度(X ,mg/mL)为横坐标、吸光度(Y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程 $Y = 0.0132X - 0.0045$ ($r = 0.9999$, $n = 5$)。结果显示,芦丁质量浓度在0.010 0~0.050 2 mg/mL范围内与吸光度线性关系良好。

精密度、稳定性、重复性试验:按相关要求方法进行方法学考察。结果精密度、稳定性、重复性试验的RSD均小于2.0%,表明仪器精密度良好,供试品溶液在室温放置12 h内基本稳定,方法重复性良好。

含量测定:取样品适量,按上述制备方法制备供试品溶液,以回归方程计算含量,按去氢二异丁香酚含量测定项下方法处理数据。结果,辐照样品中总黄酮含量与空白对照样品间的差异无统计学意义($P > 0.05$)。详见表1。

2.5 微生物检查

参照2020年版《中国药典(四部)》通则1105非无菌产品微生物限度检查:微生物计数法、通则1106非无菌产品微生物限度检查:控制菌检查法及通则1107非无菌药品微生物限度标准,对样品进行随机取样,检查细菌、霉菌和酵母菌、大肠菌群总数,均平行2次。结果样品在辐照前后均未检出大肠菌群;随着辐照剂量的增加,细菌总数、霉菌和酵母菌总数均显著降低($P < 0.05$)。当辐照剂量为8 kGy时,细菌总数远低于药典中非无菌药品微生物限度标准,且未检出霉菌和酵母菌;当辐照剂量为10 kGy时,未检出上述微生物。详见表3。

3 讨论

3.1 辐照灭菌的应用

中药材的微生物控制是中药材质量提高的重要指

表3 样品微生物检测结果($n = 2$)

Tab. 3 Results of microbial test of samples ($n = 2$)

辐照剂量(kGy)	细菌(cfu/g)	霉菌和酵母菌(cfu/g)	大肠菌群(mpn/g)
0	640 025 / 640 008	6 517 / 6 500	N / N
2	470 021* / 470 005*	3 345* / 3 357*	N / N
4	330 031* / 330 010*	118* / 105*	N / N
6	164 325* / 164 310*	N* / N*	N / N
8	65* / 50*	N* / N*	N / N
10	N* / N*	N* / N*	N / N

注:N表示未检出;与0 kGy比较,* $P < 0.05$ 。

Note: N indicates that no microorganism is detected; Compared with those at the dose of 0 kGy, * $P < 0.05$.

标。常规的中药材灭菌方法主要为干热、湿热、微波等热灭菌方式^[14]。肉豆蔻药材中含有大量的挥发性成分,常规的热灭菌易导致挥发性成分的逸失。辐照灭菌是一种冷灭菌技术^[14-15],具有温度低、穿透性高等优势,尤其适用于肉豆蔻药材等含挥发性成分或热不稳定性成分药材的灭菌。传统的辐照灭菌以⁶⁰Co为主,但存在建设及防护成本高、灭菌周期长等弊端,应用受限。电子束辐照是一种新兴的辐照灭菌技术,具有能量可控、束流定向、灭菌周期短、建设及防护成本低等优势,在医疗器械、生物医药、中药、食品灭菌领域应用广泛。

3.2 中药辐照灭菌的效应评价

常规的中药灭菌效应评价以性状、显微鉴别、薄层鉴别为定性指标,以微生物总数、单个或多个指标成分的含量为定量指标,但不能全面评价灭菌前后中药物质成分的变化,导致灭菌质量不可控,影响临床疗效。本研究中从微生物含量、去氢二异丁香酚含量、总黄酮含量、HPLC图的相似度4个角度评价灭菌效应,可确保微生物控制水平符合2020年版《中国药典》规定,也能全面评价中药物质成分的变化,为中药材的灭菌效应评价提供参考。

3.3 研究的实用性

本研究中模拟生药打粉、铝箔袋密封、运输并辐照灭菌,并根据《中药辐照灭菌技术指导原则》^[16],设定最高辐照剂量为10 kGy。不足之处,不同产地、生产厂家的肉豆蔻药材的固有微生物数量和种群、产品自身的水分和密度、外包装、辐照设备的剂量等因素均会影响辐照的灭菌效果;在实际贮藏过程中,中药材由于原料加工方法和环境卫生状况不同,初始微生物含量也有所差异^[17]。故在进行大批量产业化辐照处理时,应根据原药材的加工、储存条件、包装条件及其初始微生物的总数来确定合适的辐照剂量。

综上所述,不同剂量电子束辐照对肉豆蔻药材质量无显著影响,且辐照剂量达8 kGy时灭菌效果良好。

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,2020:141.
- [2] 方爱娟,徐凯节. 肉豆蔻的化学成分及生物活性研究进展[J]. 中国药业,2013,22(15):113-115.
- [3] 张爱武,刘乐乐,何学敏,等. 肉豆蔻化学成分与药理活性的研究进展[J]. 内蒙古医科大学学报,2014,36(1):85-88.
- [4] 马可,南星梅,赵婧,等. 肉豆蔻的药理和毒理作用研究进展[J]. 中药药理与临床,2022,38(1):218-224.
- [5] 曹阳,于明新. 肉豆蔻有效成分对急性放射性肠炎肠黏膜保护作用及相关机制研究[J]. 辽宁中医药大学学报,2019,21(1):43-46.
- [6] 李大山,曾天艳,马莎,等. 肉豆蔻中二芳基丙烷类抗炎活性成分[J]. 天然产物研究与开发,2021,33(5):779-783.