

中图分类号: R932; R283.1 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2023)21-0067-06
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2023.21.015



电子束辐照对诃子中主要活性成分及灭菌效果的影响*

汪慧慧^{1,2,3}, 谢和兵^{3,4}, 尼玛次仁⁴, 张国庆², 伍丽^{1,5}, 王彩芬⁵, 张继稳^{1,5△}

(1. 江西中医药大学药学院, 江西 南昌 330004; 2. 江苏云视药物科技有限公司, 江苏 南通 226133;
3. 江苏省南通市海门长三角药物高等研究院, 江苏 南通 226133; 4. 西藏神猴药业有限责任公司, 西藏
日喀则 857000; 5. 中国科学院上海药物研究所, 上海 201210)

摘要:目的 探讨电子束辐照对诃子灭菌效果及主要活性成分的影响。方法 采用0, 2, 4, 6, 8, 10 kGy不同辐照剂量对诃子粉末进行电子束辐照灭菌, 考察诃子粉末辐照前后的性状、薄层色谱图、高效液相色谱指纹图谱、微生物数量, 测定其中没食子酸、柯里拉京、鞣花酸3种主要活性成分的含量。结果 经不同辐照剂量灭菌后, 诃子的性状、薄层色谱图、高效液相色谱指纹图谱均无明显变化, 诃子的主要活性成分没食子酸、柯里拉京和鞣花酸的含量均无显著差异($P > 0.05$); 当辐照剂量为4 kGy及以上时, 细菌菌落总数、霉菌和酵母菌菌落总数均小于200 cfu/g, 符合2020年版《中国药典(四部)》中非无菌产品微生物限度检查的规定。结论 电子束辐照灭菌对诃子的主要活性成分无明显影响, 并在辐照剂量为4 kGy时达到灭菌要求, 适用于诃子粉末的灭菌。

关键词: 诃子; 电子束辐照灭菌; 活性成分; 灭菌效果; 薄层色谱鉴别; 高效液相色谱法; 指纹图谱

Effect of Electron Beam Irradiation on Main Active Ingredients and Sterilization Effect of Terminaliae Chebulae Fructus

WANG Huihui^{1,2,3}, XIE Hebing^{3,4}, NIMACI Ren⁴, ZHANG Guoqing², WU Li^{1,5}, WANG Caifen⁵, ZHANG Jiwen^{1,5}

(1. School of Pharmacy, Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang, Jiangxi, China 330004; 2. Jiangsu Yunshi Pharmaceutical Technology Co., Ltd., Nantong, Jiangsu, China 226133; 3. Yangtze Delta Drug Advanced Research Institute, Nantong, Jiangsu, China 226133; 4. Tibetan God Monkey Pharmaceutical Co., Ltd., Rikaze, Xizang, China 857000; 5. Shanghai Institute of Materia Medica Chinese Academy of Sciences, Shanghai, China 201210)

Abstract: Objective To investigate the effect of electron beam irradiation on the main active ingredients and sterilization effect of Terminaliae Chebulae Fructus (TCF). **Methods** Electron beam irradiation sterilization was carried out on the TCF powder at different irradiation doses of 2, 4, 6, 8, and 10 kGy. The properties, thin-layer chromatography (TLC), high-performance liquid chromatography (HPLC) fingerprints and microbial population of TCF powders were investigated, and the content of three main

* 基金项目: 西藏自治区科学技术厅-日喀则市人民政府区域科技协同创新专项项目[QYXTZX-RKZ2022-07]。

第一作者: 汪慧慧, 女, 硕士研究生, 研究方向为中药药剂学, (电子信箱) hhwang.hm@simm.ac.cn。

△通信作者: 张继稳, 男, 博士, 研究员, 研究方向为药剂学, (电子信箱) jwzhang@simm.ac.cn。

Neuropharmacology, 2014, 85: 113-120.

[27] KUMPHUNE S, CHATTIPAKORN S, CHATTIPAKORN N. Roles of p38-MAPK in insulin resistant heart: Evidence from bench to future bedside application [J]. Curr Pharm Des, 2013, 19(32): 5742-5754.

[28] 赵亮, 梅方超, 洪育蒲, 等. p38丝裂原活化蛋白激酶抑制剂对妊娠晚期合并急性胰腺炎相关胎鼠肺脏损伤的作用研究[J]. 中华急诊医学杂志, 2019, 28(10): 1245-1250.

[29] LIU P, GAO Q, GUAN L, et al. Atorvastatin attenuates Isoflurane-Induced activation of ROS-p38MAPK/ATF2 pathway, neuronal degeneration, and cognitive impairment of the aged mice [J]. Front Aging Neurosci, 2020, 12: 620946.

[30] KIM HS, KIM Y, LIM MJ, et al. The p38-activated ER stress-ATF6 α axis mediates cellular senescence [J]. Faseb J, 2019, 33(2): 2422-2434.

[31] LI WM, YANG Q, MAO ZX. Signaling and induction of chaperone-mediated autophagy by the endoplasmic reticulum under stress conditions [J]. Autophagy, 2018, 14(6): 1094-1096.

[32] TOBIUME K, MATSUZAWA A, TAKAHASHI T, et al. ASK1 is required for sustained activations of JNK/p38 MAP kinases and apoptosis [J]. Embo Rep, 2001, 2(3): 222-228.

[33] 单佳铃, 程虹毓, 文乐, 等. TLR/MyD88/NF- κ B信号通路参与不同疾病作用机制研究进展 [J]. 中国药理学通报, 2019, 35(4): 451-455.

[34] CHAITHONGYOT S, JANTAREE P, SOKOLOVA O, et al. NF- κ B in gastric cancer development and therapy [J]. Bio-medicines, 2021, 9(8): 870.

[35] ALHARBI KS, FULORIA NK, FULORIA S, et al. Nuclear factor-kappa B and its role in inflammatory lung disease [J]. Chem Biol Interact, 2021, 345: 109568.

(收稿日期: 2023-02-17; 修回日期: 2023-06-07)

active ingredients (gallic acid, corilagin, and ellagic acid) before and after irradiation was determined. **Results** After sterilization with different irradiation doses, there were no significant changes in the properties, TLC, and HPLC fingerprints of TCF. The properties of main active ingredients, such as gallic acid, corilagine, and ellagic acid showed no significant differences ($P > 0.05$). When the irradiation dose was 4 kGy or above, the total number of bacterial colonies, mold, and yeast colonies were all lower than 200 cfu / g, which met the requirements for microbial limit testing of non - sterile products in the *Chinese Pharmacopoeia* (Edition 2020, Volume IV). **Conclusion** Electron beam irradiation sterilization has no significant effect on the main active ingredients of TCF, and meets the sterilization requirements at an irradiation dose of 4 kGy, which is suitable for the sterilization of TCF powder.

Key words: Terminaliae Chebulae Fructus; electron beam irradiation sterilization; active ingredients; sterilization effect; TLC; HPLC; fingerprint

藏药诃子为使君子科植物诃子 *Terminalia chebula* Retz. 或绒毛诃子 *Terminalia chebula* Retz. var. *tomentella* Kurt. 的干燥成熟果实^[1], 具有涩肠止泻、敛肺止咳、降火利咽功效。现代药理学研究表明, 诃子具有抗氧化^[2-3]、抗肿瘤^[4-5]、修复肝功能损伤^[6-7]、抗菌^[8]等活性。在藏医药中, 诃子使用频率几乎与汉医方剂中甘草等同, 被视为藏药之王^[9]。传统藏成药中诃子多以生药粉直接入药, 微生物水平为重要质控指标。酚酸类物质为诃子中主要发挥药理作用的成分^[10-11], 受热不稳定, 在干热、湿热灭菌过程中会发生聚合、水解、氧化等反应而降低含量, 影响药效^[12]。目前, 藏药企业常用的热灭菌方式并不适用于诃子的灭菌。电子束辐照灭菌技术能最大限度地保持中药材的性状、活性成分、药理作用等^[13]。本研究中比较了不同辐照剂量对诃子的性状, 薄层色谱, 主要活性成分没食子酸、柯里拉京、鞣花酸含量, 指纹图谱相似度和微生物水平的影响, 为藏药诃子的电子束辐照灭菌技术与标准的制订提供参考。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

DZ - 10 / 20 型电子加速器(安徽戈瑞电子科技有限公司); Agilent1260 型高效液相色谱仪(安捷伦科技有限公司); DHG - 9240A 型鼓风干燥箱(上海一恒科学仪器有限公司); MSA125P - CE 型电子分析天平(赛多利斯 <北京> 科学仪器有限公司, 精度为 0.01 mg); 1730R 型离心机(上海贝晶生物技术有限公司); SB - 5200DT 型超声波清洗机(宁波新芝生物科技股份有限公司, 功率为 120 W, 频率为 40 kHz); KWF - 20 型超微粉碎机(浙江瑞昊机器制造有限公司); Master - S15UR 型纯水仪(上海和泰仪器有限公司); N - 1300 型旋转蒸发仪(上海爱朗仪器有限公司)。

1.2 试剂

诃子(西藏神猴药业有限责任公司, 批号为 20200201), 经西藏神猴药业有限责任公司尼玛次仁副主任药师鉴定为正品; 没食子酸对照品(批号为 110831 - 201906, 含量 $\geq 91.50\%$), 柯里拉京对照品(批号为 111623 -

200302), 鞣花酸对照品(批号为 111959 - 201903, 含量 $\geq 88.80\%$), 诃子对照药材(批号为 121015 - 201605), 均购于中国食品药品检定研究院; 甲醇(色谱纯, 批号为 221027100215), 乙腈(色谱纯, 批号为 221013100157), 磷酸(优级纯, 批号为 71807089), 均购于上海迈瑞尔化学技术有限公司; 冰醋酸(分析纯, 上海麦克林生化科技股份有限公司, 批号为 C14357167); 乙醇(批号为 20220826), 硫酸(批号为 20210514), 甲苯(批号为 20211209), 均为分析纯, 购于国药集团化学试剂有限公司; 水为纯水(实验室自制)。

2 方法与结果

2.1 样品制备与辐照处理

取诃子样品适量, 粉碎, 过 9 号筛, 分装于铝箔袋密封储存, 每袋 12 g。由中广核戈瑞科技有限公司采用电子加速器对诃子粉末进行灭菌处理, 设置辐照剂量分别为 0, 2, 4, 6, 8, 10 kGy, 各 6 袋。

2.2 性状比较

于日光下观察诃子粉末的外观聚集状态, 通过口尝、鼻嗅等对其性味进行直观判断。与未辐照样品(0 kGy)比较, 辐照前后诃子粉末外观、色泽、气味均未发生明显变化, 表明电子束辐照灭菌技术对诃子粉末性状无明显影响。详见图 1。

2.3 薄层色谱鉴别

取未辐照(0 kGy)及不同辐照剂量(2, 4, 6, 8, 10 kGy)下的诃子粉末 0.5 g, 精密称定, 加入 30 mL 无水乙醇, 加热回流 30 min, 抽滤, 滤液旋转蒸干, 加 5 mL 甲醇溶解残余物, 通过中性氧化铝柱(100 ~ 200 目, 5 g, 内径 2 cm), 加 50 mL 50% 乙醇洗脱, 收集洗脱液, 水浴蒸干; 加 5 mL 纯水溶解残渣, 通过 C_{18} 固相萃取柱(300 mg), 加 10 mL 30% 甲醇洗脱, 弃去洗脱液; 加 10 mL 甲醇第 2 次洗脱, 收集洗脱液, 水浴蒸干; 残渣加 1 mL 甲醇使溶解, 作为供试品溶液。另取诃子对照药材 0.5 g, 同法制备对照药材溶液。参照 2020 年版《中国药典(四部)》0502 薄层色谱法试验, 取上述 2 种溶液各 4 μ L, 点于同一硅胶 G 薄层板上, 以甲苯 - 冰醋酸 - 水(12:10:0.4, V/V/V)为展开剂, 展开, 取出, 干燥, 喷以 10% 乙

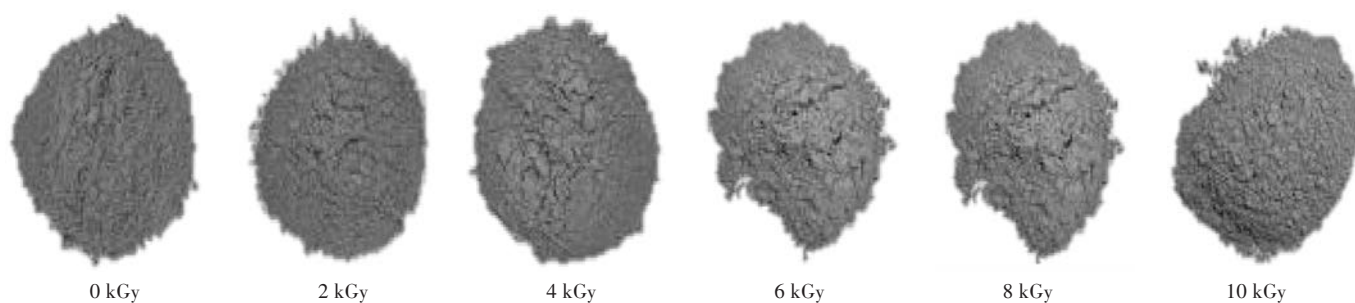
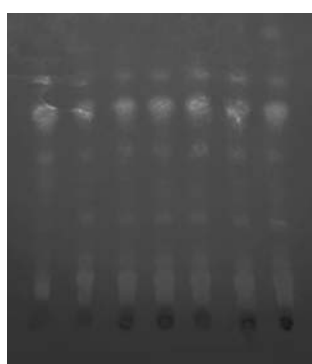


图1 辐照前后诃子粉末的性状

Fig. 1 Properties of TCL powders before and after irradiation

醇硫酸溶液, 105 °C加热至斑点显色清晰, 置紫外光灯(365 nm)下观察。结果未经辐照处理(0 kGy)的诃子粉末和2, 4, 6, 8, 10 kGy辐照剂量下的诃子粉末的供试品溶液色谱中, 在与对照药材溶液色谱相应位置显相同颜色的斑点(比移值为0.69), 表明诃子粉未经电子束辐照灭菌后的薄层色谱无明显改变。详见图2。



1. 对照药材溶液 2-7. 供试品溶液(辐照剂量依次为0, 2, 4, 6, 8, 10 kGy)

图2 辐照前后诃子粉末薄层色谱图

1. Reference medicinal materials solution 2-7. Test solution (irradiation doses of 0, 2, 4, 6, 8, 10 kGy in sequence)

Fig. 2 TLC chromatograms of TCL powders before and after irradiation

2.4 含量测定

2.4.1 色谱条件

色谱柱: Agilent 5 TC - C₁₈(2)柱(250 mm × 4.6 mm, 5.0 μm); 流动相: 0.1%磷酸水溶液(A) - 乙腈(B), 梯度洗脱(0~15 min时 3%B → 10%B, 15~20 min时 10%B → 14%B, 20~30 min时 14%B → 17%B, 30~35 min时 17%B → 21%B, 35~45 min时 21%B → 60%B, 45~56 min时 60%B → 3%B); 流速: 1.0 mL/min; 柱温: 30 °C; 检测波长: 270 nm; 进样量: 10 μL。

2.4.2 溶液制备

分别取没食子酸对照品 10.02 mg、柯里拉京对照品 10.04 mg、鞣花酸对照品 10.02 mg, 精密称定, 置 10 mL 容量瓶中, 加甲醇溶解并定容, 摇匀, 分别制得质量浓

度为 0.917, 1.004, 0.890 mg/mL 的对照品贮备液。分别精密吸取没食子酸、柯里拉京和鞣花酸对照品贮备液 2.0, 1.0, 2.0 mL, 置 10 mL 容量瓶中, 加甲醇 - 0.1%磷酸水溶液(7:3, V/V)定容, 摇匀, 制成没食子酸、柯里拉京、鞣花酸质量浓度分别为 183.4, 100.4, 178.0 μg/mL 的混合对照品溶液。

取未经辐照的样品粉末(过 9 号筛)0.1 g, 精密称定, 置 50 mL 具塞锥形瓶中, 精密加入 70% 甲醇 30 mL, 称定质量, 超声处理(功率为 120 W, 频率为 40 kHz) 30 min, 取出, 放冷, 再称定质量, 用 70% 甲醇补足减失的质量, 摇匀, 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 即得供试品溶液。

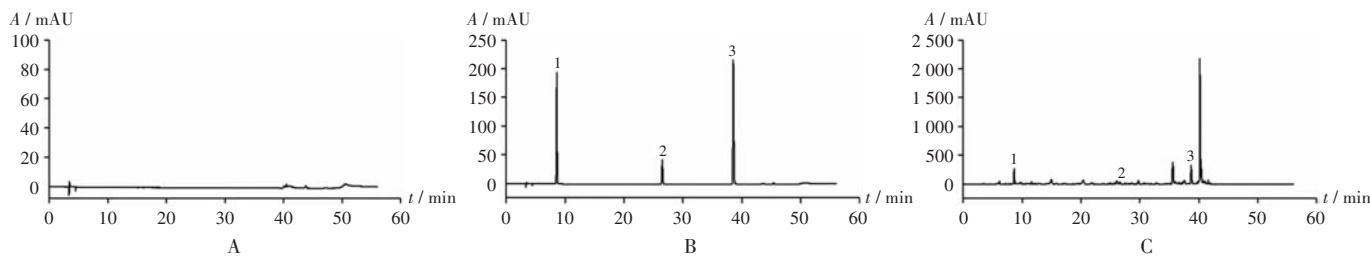
2.4.3 方法学考察

专属性试验: 取空白溶剂(70% 甲醇)及 2.4.2 项下混合对照品溶液、供试品溶液各适量, 按 2.4.1 项下色谱条件进样测定, 记录色谱图。结果显示, 70% 甲醇对没食子酸、柯里拉京、鞣花酸无干扰, 供试品溶液色谱中, 各活性成分没食子酸、柯里拉京、鞣花酸与相邻色谱峰的分离度、拖尾因子、理论板数均符合《中国药典》标准。详见图 3。

线性关系考察: 精密吸取 2.4.2 项下混合对照品溶液适量, 加甲醇 - 0.1% 磷酸水溶液(7:3, V/V)逐级稀释, 得没食子酸质量浓度分别为 183.4, 91.70, 45.85, 18.34, 9.170, 4.585 μg/mL, 柯里拉京质量浓度分别为 100.4, 50.20, 25.10, 10.04, 5.020, 2.510 μg/mL, 鞣花酸质量浓度分别为 178.0, 89.00, 44.50, 17.80, 8.900, 4.450 μg/mL 的混合对照品溶液, 按 2.4.1 项下色谱条件进样测定, 以 3 种待测成分的质量浓度(X, μg/mL)为横坐标、色谱峰峰面积积分值(Y)为纵坐标进行线性回归。结果见表 1。

定量限与检测限确定: 取 2.4.2 项下混合对照品溶液, 加甲醇 - 0.1% 磷酸水溶液(7:3, V/V)等比稀释, 按 2.4.1 项下色谱条件进样测定, 检测限按信噪比(S/N) ≥ 3 计算, 定量限按 S/N ≥ 10 计算。结果见表 1。

精密度试验: 取 2.4.2 项下混合对照品溶液适量, 按 2.4.1 项下色谱条件连续进样测定 6 次, 记录峰



1. 没食子酸 2. 柯里拉京 3. 鞣花酸

A. 空白溶剂(70% 甲醇) B. 混合对照品溶液 C. 供试品溶液

图3 高效液相色谱图

1. Gallic acid 2. Corilagin 3. Ellagic acid

A. Blank solvent (70% methanol) B. Mixed reference solution C. Test solution

Fig. 3 HPLC chromatograms

表1 线性关系考察与定量限和检测限确定结果

Tab. 1 Results of linear relation test, limits of quantification, and limits of detection

成分	回归方程	r	线性范围 ($\mu\text{g/mL}$)	定量限 ($\mu\text{g/mL}$)	检测限 ($\mu\text{g/mL}$)
没食子酸	$Y = 31.851X - 7.4795$	0.9999	4.585~183.4	0.228	0.057
柯里拉京	$Y = 16.958X - 3.926$	0.9999	2.510~100.4	0.627	0.156
鞣花酸	$Y = 41.071X + 80.7$	0.9999	4.450~178.0	0.138	0.034

面积。结果没食子酸、柯里拉京、鞣花酸峰面积的RSD分别为0.18%, 0.15%, 0.22% ($n = 6$), 表明仪器精密度良好。

重复性试验: 取未经辐照的样品粉末(过9号筛)适量, 按2.4.2项下方法平行制备供试品溶液6份, 按2.4.1项下色谱条件进样测定, 记录峰面积。根据标准曲线计算得没食子酸、柯里拉京、鞣花酸含量的RSD分别为1.25%, 1.36%, 1.73% ($n = 6$), 表明方法重复性良好。

稳定性试验: 取未经辐照的样品粉末(过9号筛)适量, 按2.4.2项下方法制备供试品溶液, 分别于常温下放置0, 2, 4, 6, 8, 12 h时按2.4.1项下色谱条件进样测定, 记录峰面积。结果没食子酸、柯里拉京、鞣花酸峰面积的RSD分别为0.33%, 1.88%, 1.39% ($n = 6$), 表明供试品溶液在常温放置12 h内稳定性良好。

加样回收试验: 取6份未经辐照的样品粉末(过9号筛)0.1 g, 精密称定, 加入与供试品中含量100%的混合对照品溶液, 按2.4.2项下方法制备供试品溶液, 按2.4.1项下色谱条件进样测定, 记录峰面积, 计算没食子酸、柯里拉京和鞣花酸的回收率。结果见表2。

2.4.4 辐照样品含量测定

取不同辐照剂量(0, 2, 4, 6, 8, 10 kGy)辐照后的诃子样品, 按2.4.2项下方法制备供试品溶液各3份, 按2.4.1项下色谱条件进样测定, 记录色谱图。以外标法计算3种成分的含量, 采用SPSS 27.0统计学软件分析,

表2 加样回收试验结果($n = 6$)

Tab. 2 Results of the recovery rest ($n = 6$)

成分	样品含量(mg)	加入量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	\bar{X} (%)	RSD(%)
没食子酸	1.854	1.852	3.634	96.11	100.98	2.51
	1.854	1.852	3.735	101.57		
	1.854	1.852	3.755	102.65		
	1.854	1.852	3.719	100.70		
	1.854	1.852	3.765	103.19		
	1.854	1.852	3.737	101.67		
柯里拉京	0.724	0.731	1.448	99.04	103.81	2.75
	0.724	0.731	1.482	103.69		
	0.724	0.731	1.476	102.87		
	0.724	0.731	1.484	103.97		
	0.724	0.731	1.509	107.39		
	0.724	0.731	1.498	105.88		
鞣花酸	2.305	2.172	4.504	101.24	101.24	3.25
	2.305	2.172	4.419	97.33		
	2.305	2.172	4.575	104.51		
	2.305	2.172	4.528	102.35		
	2.305	2.172	4.419	97.33		
	2.305	2.172	4.578	104.65		

两组间比较采用独立样本 t 检验。结果显示, 与未经辐照样品比较, 不同辐照剂量辐照后诃子的主要活性成分没食子酸、柯里拉京和鞣花酸的含量无显著差异($P > 0.05$)。详见表3。

2.5 指纹图谱相似度

通过中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012版)对所得色谱图进行处理, 以未经辐照样品(0 kGy)供试品溶液色谱图参照, 经多点校正后进行全谱峰匹配, 自动生成对照图谱(R), 详见图4。计算相似度, 各剂量辐照样品与未经辐照(0 kGy)样品的相似度均不低于0.998, 详见表4。

2.6 微生物检测

按2020年版《中国药典(四部)》通则中非无菌产

表3 不同辐照剂量对诃子中没食子酸、柯里拉京和鞣花酸含量的影响(mg/g, n=3)

Tab. 3 Effect of different irradiation doses on the contents of gallic acid, corilagin and ellagic acid in TCF(mg/g, n=3)

辐照剂量 (kGy)	没食子酸			柯里拉京			鞣花酸		
	含量	t值	P值	含量	t值	P值	含量	t值	P值
0	19.99			7.03			21.93		
2	19.00	1.636	0.150	7.50	-0.950	0.396	21.79	0.671	0.518
4	19.72	0.409	0.693	7.33	-2.325	0.058	21.84	0.390	0.705
6	20.39	-0.623	0.551	7.09	-0.371	0.719	22.61	-2.183	0.074
8	19.18	1.416	0.214	7.33	-2.482	0.054	22.34	-2.068	0.065
10	20.30	-0.381	0.711	7.27	-1.451	0.178	22.16	-0.097	0.930

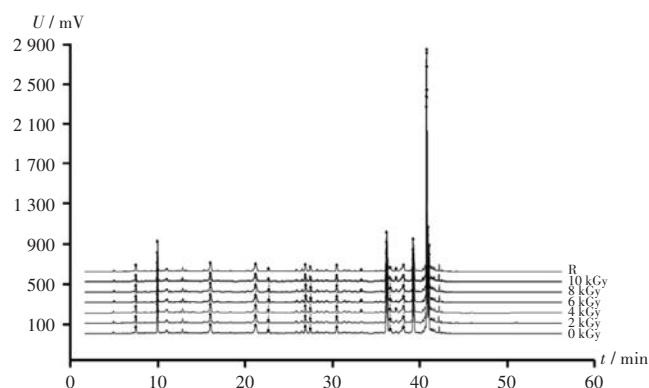


图4 辐照前后诃子供试品溶液的高效液相色谱叠加指纹图谱

Fig. 4 HPLC overlay fingerprints of the test solution of TCF before and after irradiation

表4 辐照前后诃子样品的指纹图谱相似度

Tab. 4 Fingerprint similarity of TCF before and after irradiation

辐照剂量	0 kGy	2 kGy	4 kGy	6 kGy	8 kGy	10 kGy	R
0 kGy	1.000	1.000	0.999	0.999	0.999	0.999	1.000
2 kGy	1.000	1.000	0.999	0.998	1.000	0.999	1.000
4 kGy	0.999	0.999	1.000	0.999	0.999	1.000	1.000
6 kGy	0.999	0.998	0.999	1.000	0.999	0.998	0.999
8 kGy	0.999	1.000	0.999	0.999	1.000	0.999	1.000
10 kGy	0.999	0.999	0.998	0.998	0.999	1.000	1.000
R	1.000	1.000	1.000	0.999	1.000	1.000	1.000

品微生物限度检查(1105 微生物计数法、1106 控制菌检查法、1107 非无菌药品微生物限度标准),检查电子束加速辐照前后诃子粉末中细菌菌落总数、霉菌及酵母菌菌落总数、大肠菌群的变化。结果显示,样品经辐照后,细菌菌落总数、霉菌及酵母菌菌落总数均显著下降($P < 0.05$),大肠菌群在辐照前后均未检出;当辐照剂量为4 kGy时,微生物限度已满足《中国药典》规定标准,辐照剂量为6 kGy及以上时微生物均未检出。详见表5。

3 讨论

3.1 电子束辐照剂量选择

电子束辐照灭菌技术是利用电子加速器产生的高能电子束照射物质达到灭菌目的^[14],具有流水线快速、

表5 不同辐照剂量对诃子微生物含量的影响(n=2)

Tab. 5 Effect of different radiation doses on microbial contents of TCF(n=2)

辐照剂量	细菌菌落总数 (cfu/g)	霉菌、酵母菌菌落总数 (cfu/g)	大肠菌群 (MPN/g)
0 kGy	55 020	2 525	-
	55 000	2 520	-
2 kGy	5 030*	120*	-
	5 000*	100*	-
4 kGy	75*	-	-
	50*	-	-
6 kGy	-	-	-
	-	-	-
8 kGy	-	-	-
	-	-	-
10 kGy	-	-	-
	-	-	-

注: - 表示未检出。与0 kGy比较,* $P < 0.05$ 。

Note: - refers to not detected. Compared with those at 0 kGy, * $P < 0.05$.

吸收剂量均匀、建设防护成本低等优点,广泛用于食品、化学药品、中药材及医疗器械的灭菌^[15-17]。目前,电子束辐照灭菌技术应用于藏药材的灭菌已取得显著成效^[18-19],但常用藏药材及生药粉的相关研究依然较少。根据2015年原国家食品药品监督管理总局发布的《中药辐照灭菌技术指导原则》规定辐照剂量原则上不超过10 kGy。故本研究中辐照剂量选择2,4,6,8,10 kGy,以确保中药的安全、有效与质量稳定。

3.2 诃子主要活性成分选择

诃子中的主要活性成分为酚酸类、鞣质类和黄酮类物质^[20],其中酚酸类和鞣质类物质含量较高,具有抗氧化、抗菌、抗癌、促进平滑肌收缩等药理学作用^[21],被认为是诃子质量评价的重要指标^[10,22]。没食子酸为诃子酚酸类的一种成分,具有清除自由基和抑制脂质过氧化的作用,效果远高于维生素C^[23-24]。鞣质类成分中的鞣花酸和柯里拉京可调节不同癌细胞的信号通路而

发挥抗癌作用,同时可解除致癌物的毒性^[25]。故本研究中选择没食子酸、柯里拉京和鞣花酸作为主要活性成分指标。

3.3 主要活性成分的含量测定

参考文献[11,26],对诃子中没食子酸、鞣花酸和柯里拉京的测定方法进行优化,分别考察了流动相(0.1%磷酸水溶液-乙腈、水-乙腈),柱温(25,30,35℃),供试品溶液制备方法(50%甲醇、70%甲醇),对照品稀释溶液[甲醇、70%甲醇、甲醇-0.1%磷酸水溶液(7:3,V/V)]对样品中各成分色谱峰的分离效果,确定最优条件为流动相为0.1%磷酸水溶液-乙腈,柱温为30℃,样品提取溶剂为70%甲醇,对照品稀释溶液为甲醇-0.1%磷酸水溶液(7:3,V/V)。由于没食子酸、柯里拉京和鞣花酸的极性差异较大,采用单一流动相比比例无法分离,通过梯度洗脱可有效分离3种成分。故流动相选择梯度洗脱。

3.4 方法评价

不同辐照剂量的电子束辐照对诃子粉末性状、薄层色谱鉴别、指纹图谱、主要活性成分含量均无显著影响,辐照剂量为4 kGy时已达良好的灭菌效果。本研究中为电子束辐照灭菌技术对藏药材诃子的适用性研究,为藏药材诃子、含诃子生药粉的藏成药及含酚酸类有效成分药物的辐照灭菌提供了参考。所建立的同时测定诃子中没食子酸、柯里拉京和鞣花酸含量的高效液相色谱法操作简便、结果准确,为诃子药材质量标准的提升提供了参考。

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, 2020:194.

[2] KUMAR R, ARORA R, AGARWAL A, et al. Protective effect of Terminalia chebula against seizures, seizure-induced cognitive impairment and oxidative stress in experimental models of seizures in rats[J]. J Ethnopharmacol, 2018, 215:124-131.

[3] CHANG CL, LIN CS. Phytochemical composition, antioxidant activity, and neuroprotective effect of terminalia chebula Retzius extracts [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2012, 2012:125247.

[4] 赵小霞,郭志峰,邱丽君,等. 金诃子低温提取物对神经胶质瘤C6细胞的抑制作用[J]. 山东医药, 2015, 55(14):32-34.

[5] 陈彩霞,苏秀兰. 诃子活性成分的抗肿瘤药效[J]. 生命的化学, 2019, 39(3):542-551.

[6] 乌日汉,陈玉花,肖田梅,等. 诃子对川楝子所致肝毒性的减毒作用机制初探[J]. 中医药信息, 2022, 39(1):11-18.

[7] GU L, DENG WS, LIU Y, et al. Ellagic acid protects Lipopolysaccharide / D-galactosamine-induced acute hepatic injury in mice[J]. Int Immunopharmacol, 2014, 22(2):341-345.

[8] 李永慧,张志强,吴同磊,等. 中药诃子抑制金黄色葡萄球菌生物被膜形成机制研究[J]. 中华医院感染学杂志, 2019, 29(5):646-649.

[9] AFSHARI AR, SADEGHNIA HR, MOLLAZADEH H. A review on potential mechanisms of terminalia chebula in Alzheimer's disease[J]. Adv Pharmacol Sci, 2016, 2016:8964849.

[10] 赵鹿,廖翠萍,杨秀娟,等. 诃子的研究进展及质量标志物的预测[J]. 中草药, 2020, 51(10):2732-2744.

[11] 久欣,李君,张慧文,等. 不同产地诃子中11种成分的含量测定及其化学计量学综合评价[J]. 中国药房, 2022, 33(3):299-307.

[12] RAN F, HAN X, DENG X, et al. High or low temperature extraction, which is more conducive to Triphala against chronic pharyngitis?[J]. Biomed Pharmacother, 2021, 140:111787.

[13] 王钢,王丹,何毅,等. 麦冬、大黄饮片电子束辐照灭菌工艺研究[J]. 核农学报, 2022, 36(8):1579-1588.

[14] 采金金,谢和兵,尼玛次仁,等. 电子加速器辐照灭菌对肺热普清散质量的影响[J]. 中国药业, 2023, 32(4):70-74.

[15] 叶力取,牛耀星,王燕,等. 低剂量电子束辐照对徐香猕猴桃生理品质与氧化酶的影响[J]. 食品工业科技, 2023, 44(14):355-362.

[16] 石梦琦,冯涛,孔秋莲,等. 电子束辐照对冷鲜猪里脊肉风味的影响[J]. 食品研究与开发, 2023, 44(3):72-78.

[17] 于明,王丹,王钢,等. 电子束辐照对天麻粉灭菌效果及品质的影响[J]. 核农学报, 2022, 36(11):2175-2182.

[18] 德吉卓嘎,王玮,德吉措姆,等. 电子束对藏药八味沉香散的辐照效应[J]. 辐射研究与辐射工艺学报, 2022, 40(5):65-72.

[19] 王玮,德吉卓嘎,白央,等. 电子束对藏药十一味能消丸的辐照效应[J]. 西藏科技, 2022(11):67-73.

[20] 李华爽,刘永建,杨洪柳,等. 诃子化学成分、药理作用机制、质量控制及炮制研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2022, 34(12):2130-2141.

[21] 张媛媛,曾慧婷,袁源见,等. 藏药诃子的化学成分与药理活性研究进展[J]. 中国药房, 2018, 29(14):2002-2006.

[22] 詹轶雯,李金贵. 诃子活性成分及抑菌作用研究进展[J]. 中兽医医药杂志, 2020, 39(4):34-37.

[23] 郑雪花,杨君,杨跃辉. 没食子酸药理作用的研究进展[J]. 中国医院药学杂志, 2017, 37(1):94-98.

[24] 高雅,李骅,王四旺,等. 没食子酸的药理作用及其药物代谢动力学研究进展[J]. 西北药学杂志, 2014, 29(4):435-438.

[25] 郭增军,谭林,徐颖,等. 鞣花酸类化合物在植物界的分布及其生物活性[J]. 天然产物研究与开发, 2010, 22(3):519-524.

[26] 胡绮萍,赵书运,吴文平,等. 基于多指标成分含量测定的诃子和绒毛诃子质量分析[J]. 中药材, 2021, 44(2):374-378.

(收稿日期:2023-03-21;修回日期:2023-06-15)