

^{60}Co - γ 辐照前后姜黄 HPLC 指纹图谱和姜黄素含量变化研究

黄萌萌^{1,2}, 马振中^{1,2,3}, 刘聪燕^{1,2}, 刘玉萍^{1,2}, 瞿 鼎^{1,2}, 陈 彦^{1,2*}

1. 南京中医药大学附属中西医结合医院, 江苏 南京 210028

2. 江苏省中医药研究院, 中药组分与微生态研究中心, 江苏 南京 210028

3. 南京林业大学, 江苏 南京 210037

摘要: 目的 测定姜黄饮片中姜黄素的含量, 并建立姜黄的 HPLC 指纹图谱, 评价 ^{60}Co - γ 辐照对姜黄化学成分的影响。方法 对 ^{60}Co - γ 辐照前后 13 批次姜黄饮片粉末中姜黄素含量进行测定; 建立姜黄饮片 HPLC 指纹图谱并对其方法进行考察。采用配对样本 t 检验和中药色谱指纹图谱相似度评价软件对辐照前后姜黄化学成分变化进行分析, 结合聚类分析 (HCA) 和主成分分析 (PCA) 对辐照前、后样品进行综合评价, 并对 3 批次姜黄样品辐照后 3、6 个月的稳定性进行了考察。结果 13 批次姜黄粉末辐照前后姜黄素含量无统计学差异 ($P>0.05$); 姜黄 HPLC 指纹图谱确定了 16 个共有峰, 各批次姜黄辐照前后指纹图谱的相似度均大于 0.998; 同批次辐照前与辐照后样品聚类一致性较好, 3 批次辐照前后姜黄样品放置 3、6 个月后与 0 个月相比姜黄素含量变化 $\text{RSD}<5\%$, 指纹图谱相似度均大于 0.95。结论 ^{60}Co - γ 辐照对姜黄中姜黄素含量和整体化学成分一致性基本无影响, 且不影响其稳定性, 通过指纹图谱结合指标成分含量分析可以更好地评价 ^{60}Co - γ 辐照对姜黄化学成分的影响, 为姜黄辐照灭菌方式的选择提供了实验依据。

关键词: 姜黄; ^{60}Co - γ 辐照; 姜黄素; 指纹图谱; 稳定性

中图分类号: R286.2

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2019)08-1972-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.08.030

HPLC fingerprints and curcumin content of *Curcuma Longa* before and after irradiation by ^{60}Co - γ

HUANG Meng-meng^{1,2}, MA Zhen-zhong^{1,2,3}, LIU Cong-yan^{1,2}, LIU Yu-ping^{1,2}, QU Ding^{1,2}, CHEN Yan^{1,2}

1. Affiliated Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210028, China

2. Multi-component of Traditional Chinese Medicine and Microecology Research Center, Jiangsu Provincial Academy of Chinese Medicine, Nanjing 210028, China

3. Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China

Abstract: Objective To evaluate the effect of irradiation of ^{60}Co - γ on composition change of *Curcuma Longa* through HPLC fingerprint analysis and determination of curcumin content. **Methods** An Agilent SB-C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) was used as the column. Curcumin content was measured according to the method in 2015 edition of the “Pharmacopoeia of the People’s Republic of China”. Acetonitrile-0.1% phosphoric acid aqueous solution was used as the mobile phase of fingerprint analysis, and it was programmed in a gradient elution model and the detection wavelength was 240 nm. The effects of irradiation on content of curcumin and components change were analyzed by paired t -test and similarity evaluation. And then the comprehensive evaluation of constituent difference of *C. Longa* before and after irradiation was carried out by HCA and PCA analysis. Further more the stability of curcumin content and fingerprint similarity of three patches samples storage for 3 and 6 months was compared with that of 0 month. **Results** There was no significant difference before and after irradiation for curcumin content ($P > 0.05$). The fingerprints of *C. Longae* were established and 16 peaks were identified as the common peaks. The similarity of each batch before and after irradiation was more than 0.998 and the same batch before and after irradiation have better clustering consistency. The changes of curcumin content

收稿日期: 2018-11-09

基金项目: 江苏省医学重点人才项目 (ZDRCA2016036)

作者简介: 黄萌萌 (1987—), 女, 研究实习员, 主要从事中药制剂质量评价研究。Tel: 15952052285 E-mail: huangmengmengfish@126.com

*通信作者 陈 彦 (1968—), 女, 博士, 研究员, 博士生导师, 主要从事中药新制剂、新剂型的研究。

Tel: 13805157904 E-mail: ychen202@hotmail.com

for 3 and 6 months compared with 0 month was less than 5%, and the fingerprint similarity was all greater than 0.95. **Conclusion** The established fingerprinting method is accurate and reliable. $^{60}\text{Co}-\gamma$ irradiation has no significant effect on the curcumin content and chemical composition consistency of *C. Longa*, which did not affect its stability. It was a good way to evaluate the $^{60}\text{Co}-\gamma$ irradiation effect on *C. Longa* by combining fingerprint analysis and the index components content determination. This method can provide reference for the utilization of irradiation on *C. Longa*.

Key words: *Curcuma longa* L.; $^{60}\text{Co}-\gamma$ irradiation; curcumin; HPLC fingerprint; stability

中药来源于天然植物、动物、矿物等,其中含有较多的微生物,自《中国药典》2005 年版(以下简称《中国药典》)收载中药微生物限度之后,药品标准中对中药微生物限度要求越来越严格,《中国药典》2020 年版编制大纲拟要求中药饮片增加微生物限度检查,因此随着全面提升中药产业发展水平的需求与中药质量标准的提升,如何因药制宜选择合适的灭菌方式极其重要^[1-2]。辐射杀菌技术是《中国药典》认可的灭菌方法之一,最常用的为 $^{60}\text{Co}-\gamma$ 射线辐射灭菌,作为一种冷灭菌技术,其具有杀菌效果彻底、迅速等优势,适用于含挥发性成分药材的灭菌^[3-4],含有药材原粉的固体制剂为中药辐射灭菌的主要对象。但关于辐照灭菌的安全性目前尚存争议^[5-6],上世纪 80 年代我国开展了 $^{60}\text{Co}-\gamma$ 射线辐照中药灭菌工艺和质量评价研究,先后共进行了 200 多种药材和中成药 $^{60}\text{Co}-\gamma$ 射线辐照前后的质量考察,采用现代检测仪器与药理毒理实验方法,肯定了辐照灭菌效果,除少数中药如秦艽、龙胆外,大部分经考察的品种均未见明显成分与药效的变化,在此基础上卫生部发 [1997] 第 38 号列出了《允许辐照药材品种》名录^[7-11],原则上未列入名录的品种不允许辐照。但部分中药生产企业常在实际生产中未经系统研究即对原生药粉直接入药的散剂和丸剂采用 $^{60}\text{Co}-\gamma$ 射线辐照进行灭菌^[12-13],国家食品药品监督管理局于 2015 年颁布《中药辐照灭菌技术指导原则》,规定中药采用辐照灭菌应充分说明其必要性^[14]。如意金黄散、避瘟散、跌打丸等成方制剂均以姜黄原生药粉入药,姜黄作为传统中药,主要含有姜黄素类成分和挥发油等,常外用^[15-17],因此姜黄饮片及含姜黄丸散制剂在生产中存在辐照灭菌的需求,但姜黄未被列入卫生部发 [1997] 第 38 号允许辐照的药材品种名录,且针对 $^{60}\text{Co}-\gamma$ 辐照对姜黄化学成分的影响尚无文献报道。因此开展辐照对姜黄有效成分的影响研究,明确 $^{60}\text{Co}-\gamma$ 辐照在姜黄及其制剂灭菌中的应用范围是一种比较现实的选择,具有实际指导意义。因此本研究采用姜黄素含量测定结合指纹图谱的方法,对 13 批次辐照前后共 26 份姜黄样品指纹图谱和姜黄素含量进行分析,采用配对样本 *t* 检验和《中

药色谱指纹图谱相似度评价系统》(国家药典委员会 2004A 版)对结果进行评价,并对其放置 0~6 个月过程中 3 批次辐照前后姜黄样品中姜黄素含量和指纹图谱稳定性进行考察,以明确辐照是否对姜黄所含化学成分产生影响,进而说明姜黄饮片能否采用 $^{60}\text{Co}-\gamma$ 进行辐照,为姜黄及含姜黄中成药灭菌方式的选择提供参考。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Agilent 1260 高效液相色谱仪(四元泵、自动进样器、柱温箱、DAD 检测器,美国安捷伦公司); KQ-5200 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); HH 数显恒温水浴锅(江苏金坛市金城国胜实验仪器厂); XP6 型百万分之一精密天平(梅特勒-托利多仪器有限公司); FA2104 万分之一分析电子天平(上海良平仪器仪表有限公司); TG16W 高速离心机(长沙湘智离心机仪器有限公司); DW 调温电热器(上海平环燃烧设备工程技术有限公司); FW100 高速万能粉碎机(天津市泰斯特仪器有限公司)。

1.2 试药与试剂

对照品姜黄素(批号 110823-201405)购于中国食品药品检定研究院;双去甲氧基姜黄素(批号 1w15121603)、去甲氧基姜黄素(批号 1w16032302)购于南京良纬生物科技有限公司,质量分数均大于 98%。乙腈(HPLC)、甲醇(HPLC),Tedia 公司;磷酸、醋酸为分析纯(南京化学试剂股份有限公司);水为 Millipore 超纯水;市售姜黄饮片,购于安徽亳州药材市场,编号 S1~S13,批号分别为 20160503、20170204、20170201、20170304、20170305、20170406、20170407、20170408、20170319、20170420、20170501、20170502、20170513。

2 方法与结果

2.1 姜黄辐照处理

13 批次姜黄粉碎,过 80 目筛,粉末采用 $^{60}\text{Co}-\gamma$ 射线进行辐照,辐照剂量 12 kGy,辐照前样品标记

为样品编号加后缀“BI”(before irradiation), 辐照后样品标记为样品编号加后缀“AI”(after irradiation)。

2.2 姜黄辐照前后姜黄素含量变化分析

2.2.1 对照品溶液的制备 取姜黄素对照品 2.00 mg, 精密称定, 置于 20 mL 量瓶中, 加适量甲醇使其溶解, 定容至刻度, 得姜黄素对照品储备液。精密量取姜黄素对照品储备液 1 mL, 置于 10 mL 量瓶中, 加甲醇定容, 配制成含姜黄素 10 $\mu\text{g/mL}$ 的对照品溶液, 备用。

2.2.2 供试品溶液的制备 取姜黄粉末 0.2 g, 精密称定, 置 100 mL 圆底烧瓶中, 精密加入甲醇 10 mL, 称定质量, 加热回流 30 min, 放冷, 再称定质量, 用甲醇补足减失的质量, 摇匀, 离心, 精密量取上清液 1 mL, 置 20 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 即得供试品溶液。

2.2.3 色谱条件 色谱柱: Agilent ZORBAX SB-C₁₈ (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm), 保护柱: Agilent C₁₈ ODS (12.5 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm); 乙腈-4%冰醋酸水溶液 (48:52) 为流动相, 等度洗脱 15 min, 柱温为 35 $^{\circ}\text{C}$, 检测波长为 430 nm。

2.2.4 样品分析 取辐照前后样品 S1~S13, 按“2.2.1”项下方法平行制备供试品溶液各 2 份, 各取 5 μL 在“2.2.3”项色谱条件下平行测定 2 次, 精密吸取对照品溶液和供试品溶液各 5 μL , 注入高效液相色谱仪, 按上述色谱条件进行分析, 对照品与供试品溶液色谱图见图 1。记录峰面积, 采用外标一点法计算样品中姜黄素含量。13 批次姜黄药材粉末辐照前后样品中姜黄素含量测定结果见表 1。

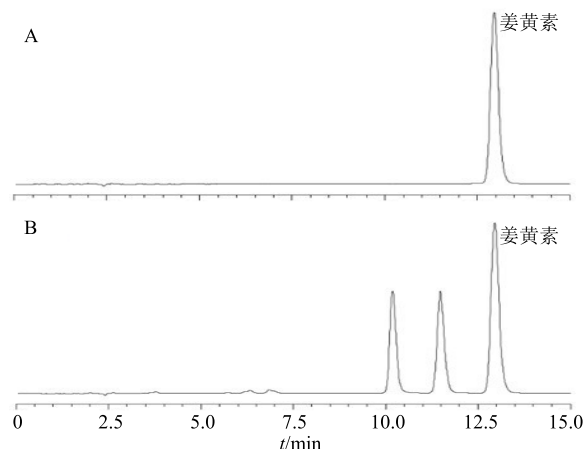


图 1 姜黄对照品溶液 (A) 与供试品溶液 (B) HPLC 色谱图
Fig. 1 HPLC of reference solution (A) and sample solution (B)

表 1 姜黄辐照前后姜黄素含量测定结果 ($n=3$)

Table 1 Content determination results of samples ($n=3$)

样品	质量分数/%		相对含量/%
	辐照前	辐照后	
S1	1.75	1.66	-5.14
S2	1.34	1.30	-2.99
S3	1.34	1.26	-5.97
S4	1.17	1.30	11.11
S5	1.24	1.47	18.55
S6	1.43	1.40	-2.10
S7	1.30	1.40	7.69
S8	1.38	1.44	4.35
S9	1.29	1.25	-3.10
S10	1.38	1.37	0.72
S11	1.13	1.18	4.42
S12	1.35	1.36	0.74
S13	1.04	1.05	0.96
平均值	1.32	1.34	2.29

$$\text{相对含量} = (M_{\text{辐照后}} - M_{\text{辐照前}}) / M_{\text{辐照前}}$$

$M_{\text{辐照后}}$ 为辐照后姜黄药材中姜黄素质量分数, $M_{\text{辐照前}}$ 为未辐照姜黄药材中姜黄素质量分数

《中国药典》2015 年版姜黄饮片项下要求其姜黄素质量分数不得少于 0.90%, 测定结果显示, 13 批次辐照前后药材中姜黄素质量分数均大于 1.00%, 均符合药典规定。姜黄辐照前后姜黄素相对含量变化, 结果见表 1, 由结果可见除 S4、S5 姜黄辐照后与辐照前相对含量变化超出 $\pm 10\%$ 外, 其他 11 批姜黄辐照后相对含量变化均在 $\pm 10\%$ 内; 对 13 批样品辐照前后姜黄素含量进行配对样本 t 检验, 结果表明 $P > 0.05$ ($P = 0.375$), 说明在此辐照剂量下姜黄经辐照后姜黄素的量与辐照前差异无显著性。

2.3 姜黄辐照前后指纹图谱变化分析

2.3.1 色谱条件 色谱柱: Agilent ZORBAX SB-C₁₈ (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm), 保护柱: Agilent C₁₈ ODS (12.5 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈 (A) -0.1%磷酸水溶液 (B); 检测波长 240 nm; 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$; 进样量为 5 μL 。梯度洗脱程序如下: 0~5 min, 30%~48% A; 5~18 min, 48%~55% A; 18~23 min, 55%~65% A; 23~35 min, 65%~72% A; 35~40 min, 72%~100% A; 40~50 min, 100% A。

2.3.2 对照品溶液的制备 取姜黄素对照品 2.00 mg、双去甲氧基姜黄素对照品 2.00 mg、去甲氧基姜黄素对照品 2.00 mg，精密称定，置于 10 mL 量瓶中，加适量甲醇使其溶解，定容至刻度，得混合对照品储备液。

2.3.3 供试品溶液的制备 取姜黄粉末约 0.2 g，精密称定，置具塞锥形瓶中，精密加入甲醇 50 mL，称定质量，超声提取 30 min，放冷，再称定质量，用甲醇补足减失的质量，摇匀，13 000 r/min 离心 10 min，取上清液，即得。

2.3.4 精密度试验 取样品 S3（批号 20170201-BI），按“2.3.3”项下方法制备 1 份供试品溶液，在“2.3.1”项下色谱条件连续进样 6 次，记录色谱图，由于姜黄素在各批次样品中均存在，分离度好且峰面积较大，故选择姜黄素（6 号峰）作为参照峰（S）计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积，结果表明各共有峰相对保留时间 RSD<0.1%，相对峰面积 RSD<2.75%，RSD 均在 3% 内，表明仪器精密度良好。

2.3.5 重复性试验 取样品 S3（批号 20170201-BI），按“2.3.3”项下方法平行制备供试品溶液 6 份，在“2.3.1”项下色谱条件进样分析，记录色谱图，以姜黄素为参照峰，计算得各共有峰的相对保留时间 RSD<0.06%，相对峰面积 RSD<4.23%，RSD 均在 5% 以内，表明该方法重复性良好。

2.3.6 稳定性试验 取样品 S3（批号 20170201-BI），按“2.3.3”项下方法制备供试品溶液，在“2.3.1”项下色谱条件于 0、2、4、8、12、24 h 进样分析，记录色谱图，以姜黄素为参照峰，计算得各共有峰的相对保留时间 RSD<0.07%，相对峰面积 RSD<4.28%，RSD 均在 5% 以内，表明姜黄供试品溶液于室温下贮存 24 h 内稳定性良好。

2.3.7 相似度评价 取 13 批次辐照前后姜黄样品，按“2.3.3”项下方法制备供试品溶液，按照“2.3.1”项下色谱条件进行分析，得到 13 批次姜黄辐照前后样品共计 26 份样品的色谱图。分别以 13 批次姜黄辐照前与 13 批次辐照后样品建立指纹图谱，将 S1（BI）和 S1（AI）设为参照谱，时间宽度为 0.10，采用中位数法，生成对照图谱，辐照前与辐照后均确定 16 个色谱峰为姜黄样品所共有，且共有峰的总面积占总峰面积的 90% 以上，因此确定这 16 个色谱峰为姜黄的指纹图谱共有峰，建立指纹图谱，辐照前与辐照后指纹图

谱见图 2，对照指纹图谱见图 3。采用化学对照品指认出其中的 3 种成分，其中 4 号峰为双去甲氧基姜黄素，5 号峰为去甲氧基姜黄素，6 号峰为姜黄素。以姜黄素为参照峰（S），取 13 批次姜黄药材辐照前后样品和对照药材指纹图谱计算各色谱峰保留时间和峰面积与同一图谱中 S 峰的保留时间和峰面积的比值，得到相对保留时间和相对峰面积，结果表明，各共有峰的相对保留时间 RSD 均小于 5%，说明共有峰出峰时间较稳定，各共有峰相对峰面积 RSD 在 9.62%~34.74%，说明不同生产批次姜黄样品各成分含量存在一定的差异。

以 13 批次辐照前样品建立指纹图谱，每批样

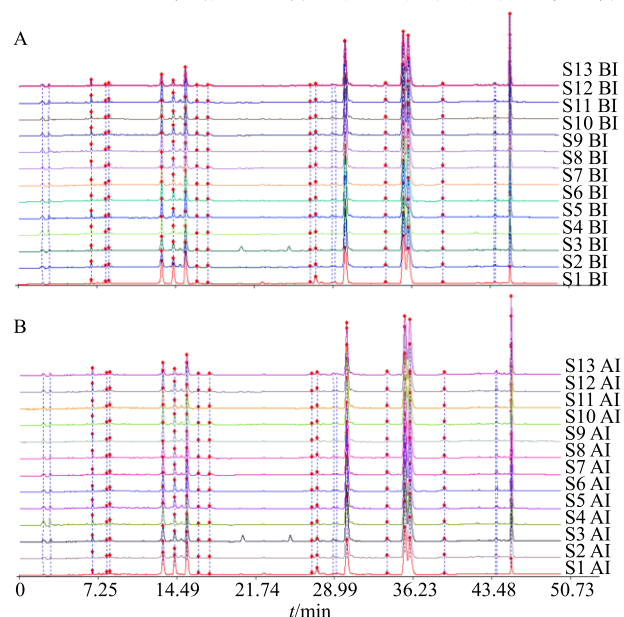


图 2 13 批姜黄辐照前 (A) 与辐照后 (B) 样品 HPLC 色谱图

Fig. 2 HPLC fingerprints of 13 batches of *C. longa* before (A) and after (B) irradiation by $^{60}\text{Co-}\gamma$

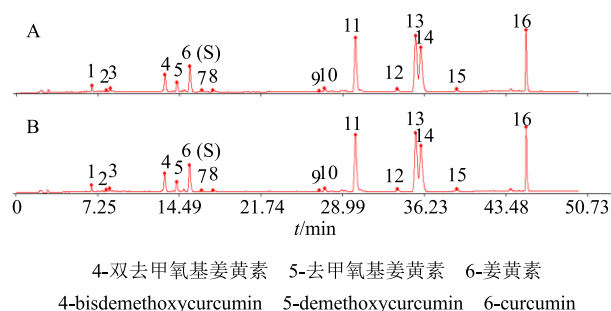


图 3 姜黄辐照前 (A) 与辐照后 (B) HPLC 对照指纹图谱
Fig. 3 Reference fingerprints of *C. longa* before (A) and after (B) irradiation by $^{60}\text{Co-}\gamma$

品与对照指纹图谱相似度分别为 0.957、0.996、0.998、0.989、0.996、0.997、0.996、0.995、0.999、1.000、0.994、0.999、0.991；以 13 批次辐照后样品建立指纹图谱，每批样品与对照指纹图谱相似度分别为 0.955、0.996、0.997、0.997、0.998、0.998、0.996、0.994、1.000、1.000、0.994、0.999、0.986；说明辐照前与辐照后样品各批次一致性均较好。13 批辐照后样品与辐照前样品所建立的对照指纹图谱相似度分别为 0.954、0.994、0.997、0.995、0.996、0.999、0.997、0.995、1.000、0.999、0.992、0.998、0.989；13 批辐照前样品建立的对照指纹图谱与辐照后样品建立的对照指纹图谱相似度为 0.954。13 批次辐照前与其相应辐照后样品相似度分别为 1.000、1.000、1.000、0.999、1.000、1.000、1.000、1.000、1.000、1.000、0.999、1.000、1.000、均大于 0.998。

由以上结果可知，分别以辐照前和辐照后样品建立指纹图谱共有模式，各批样品与对照指纹图谱相似度均大于 0.95，辐照前样品与辐照后样品间相似度也均大于 0.95，因此根据 13 批次结果说明不同批次姜黄样品整体一致性较好，且辐照前后样品中成分种类基本无变化，辐照对姜黄整体化学成分影响较小。

2.4 化学计量学分析

2.4.1 聚类分析 将 26 份姜黄样品 16 个共有峰的相对峰面积数据输入 SPSS 21.0 软件，对样品进行系统聚类，采用组间均连法，以欧式平方距离为分类依据，结果见图 4，由图可见同一批次辐照前(BI)与辐照后样品(AI)均能很好地聚为一类，与相似度分析结果一致(辐照前与辐照后相似度均大于 0.998)。13 批次姜黄样品聚为 3 类，第 1 类为样品 S2~S12，第 2 类样品为 S13，第 3 类样品为 S1，说明样品批次间存在一定的差异。

2.4.2 主成分分析 将 13 批辐照前后姜黄样品中 16 个共有峰的相对峰面积数据导入 SIMCA-P (version 13.0.3) 软件中，进行主成分分析，从 16 个指标中提取出 2 个贡献率较大的主成分， $t[1]$ 、 $t[2]$ 解释了原始数据的 74.2%，因此选取 $t[1]$ 、 $t[2]$ 2 个新变量对样品进行主成分分析，得到样品主成分分析得分图，结果见图 5，由图可见，13 批样品分为 2 类，辐照前后样品 S1 单独聚为一类，S2~S13 样品聚为一类，S1 样品与对照指纹图谱相似度在 0.95 左右，其他 12 批次样品与对照指纹图谱相似度均

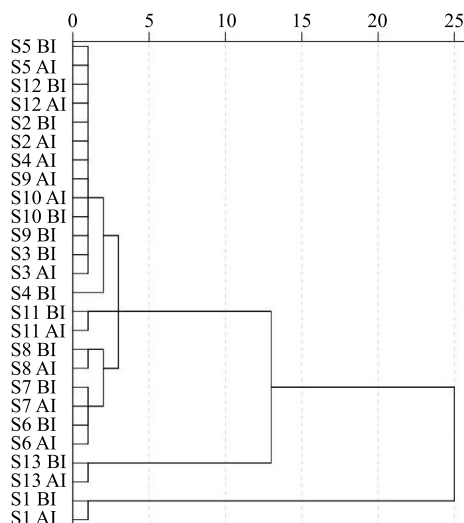


图 4 13 批次辐照前后姜黄样品聚类分析树状图

Fig. 4 Dendrogram of cluster analysis of 13 batches of *C. longa* before and after irradiation by $^{60}\text{Co-}\gamma$

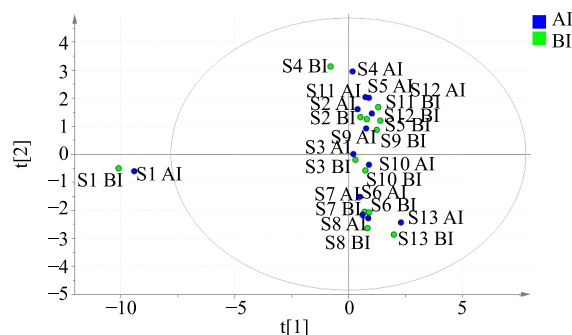


图 5 13 批次辐照前后姜黄样品主成分得分

Fig. 5 PCA score scatter plot of 13 batches of *C. longa* before and after irradiation by $^{60}\text{Co-}\gamma$

大于 0.98，因此主成分分析与相似度分析结果一致。主成分分析结果同样表明同一批次辐照前(BI)与辐照后(AI)样品均能够很好地聚为一类。

聚类分析与主成分分析结果均表明同一批次辐照前与辐照后样品能很好的聚类，因此在指纹图谱相似度评价的基础上结合化学计量学评价可更有力证明辐照前后样品整体化学信息的一致性，说明辐照对样品整体成分的影响较小。

2.5 姜黄辐照前后稳定性考察

2.5.1 姜黄辐照前后样品中姜黄素含量稳定性考察 姜黄样品放置 3、6 个月后，采用“2.2”项下姜黄含量测定方法对辐照前后 3 批次姜黄样品(S1、S2、S3)中姜黄素含量进行测定，结果见表 2。

表 2 姜黄辐照前后姜黄素含量稳定性考察
Table 2 Stability of content of curcumin of *C. longae*

样品类别	样品编号	姜黄素/%			RSD/%
		0 个月	3 个月	6 个月	
辐照前	S1	1.75	1.64	1.66	3.49
	S2	1.34	1.35	1.45	4.33
	S3	1.34	1.30	1.35	2.02
	平均值	1.48	1.43	1.49	2.07
辐照后	S1	1.66	1.52	1.58	4.44
	S2	1.30	1.29	1.37	3.17
	S3	1.26	1.22	1.28	2.53
	平均值	1.41	1.34	1.41	2.71

由结果可见, 放置 0、3、6 个月后 3 批次样品 S1、S2、S3 辐照前与辐照后姜黄素含量变化 RSD 均小于 5%, 因此认为辐照前后姜黄样品放置 6 个月过程中姜黄素变化较小, 含量较为稳定。

2.5.2 姜黄辐照前后样品指纹图谱稳定性考察
采用“2.3”项下建立的姜黄指纹图谱分析方法分别于放置 3、6 个月时对 3 批次辐照前后姜黄样品(S1、S2、S3) 进行指纹图谱分析, 样品分析结果见图 6, 根据《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2004 A 版) 对放置 3、6 个月样品指纹图谱与 0 个月指纹

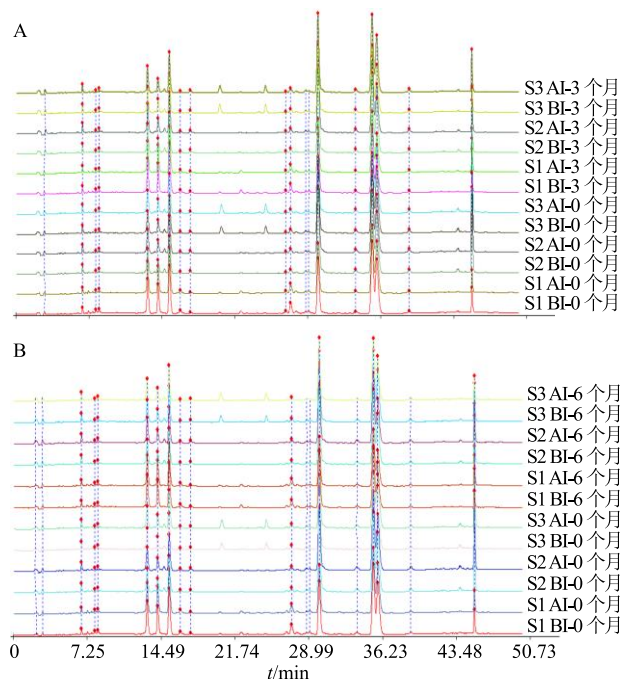


图 6 姜黄样品放置 3 个月 (A) 和 6 个月 (B) 稳定性考察 HPLC 指纹图谱

Fig. 6 HPLC fingerprint of *C. longa* compared of 3 months (A) and 6 months (B) with 0 month

图谱相似度进行分析, 结果表明放置 0 个月与 3 个月 3 批次辐照前后样品指纹图谱相似度分别为 0.985、0.990、0.994、0.991、0.980、0.991, 均大于 0.95; 放置 0 个月与 6 个月 3 批次辐照前后样品指纹图谱相似度分别为 0.985、0.990、0.994、0.991、0.988、0.978, 均大于 0.95, 表明样品放置 6 个月后整体化学成分无明显变化。

3 讨论

本研究以姜黄为研究对象, 考察 $^{60}\text{Co}-\gamma$ 辐照灭菌对其化学成分的影响, 《中国药典》规定常用辐射灭菌剂量为 25 kGy, 对原料药和最终产品尽可能采用低剂量辐照灭菌, CFDA 2015 年颁布的《中药辐照灭菌技术指导原则》建议中药最大总体平均辐照剂量原则上不超过 10 kGy, 由于辐照剂量测定存在一定的误差, 因此为充分说明辐照对姜黄化学成分的影响, 确保实验结论的可参考性, 本实验采用 12 kGy 辐照剂量对姜黄进行辐照, 继而采用 HPLC 色谱法对 13 批次姜黄样品辐照前后指纹图谱和指标成分姜黄素的含量进行了分析。指纹图谱方法建立过程中对乙腈-水、乙腈-4%冰醋酸水溶液、乙腈-0.1%磷酸水溶液洗脱系统进行了比较, 结果表明以乙腈-0.1%磷酸水溶液分离效果最佳, 色谱峰丰富, 故最终确定乙腈-0.1%磷酸水溶液为流动相; 进行 200~600 nm 波长下全波长扫描, 发现在 240 nm 处各成分均有较强吸收, 色谱峰相对较多, 故选择 240 nm 波长下进行指纹图谱分析, 建立了姜黄 HPLC 指纹图谱, 方法准确可靠。采用配对样本 *t* 检验和《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》对 13 批次样品分析结果进行评价, 结果表明在实验采用的辐照剂量下 13 批姜黄辐照前后样品中姜黄素含量无显著性差异, 辐照前与辐照后样品指纹图谱相似度均大于 0.95, 3 批次辐照前后姜黄样品放置 3、6 个月与 0 个月相比姜黄素含量变化 RSD<5%, 指纹图谱相似度均大于 0.95, 进一步结合聚类分析和主成分分析结果证明辐照前后样品整体化学信息具有较好的一致性。因此根据 13 批次姜黄指标成分和指纹图谱相似度及稳定性考察综合评价, 辐照前后样品中成分种类及姜黄素含量无显著变化。

综上所述, 在实验采用的辐照剂量下, 通过指标成分姜黄素含量测定和指纹图谱分析及放置 6 个月稳定性考察结果, $^{60}\text{Co}-\gamma$ 辐照对姜黄药材指标成分含量和整体化学成分影响相对较小。因此根据 HPLC 所提供的化学成分谱信息, 本研究结果

提示 ^{60}Co - γ 辐照灭菌对姜黄主要成分影响较小, 为姜黄采用辐照灭菌可行性提供了理论支撑, 但在实际应用中, 尚需采用与适应症相关的药效指标进一步评价其药效学是否一致, 进而保证姜黄药材和含姜黄类中成药临床应用的有效性及其安全性。

参考文献

- [1] 严丹, 袁星, 解达帅, 等. 中药饮片灭菌的研究现状与思考 [J]. 中草药, 2016, 47(8): 1425-1429.
- [2] 关于对《中国药典》2020年版微生物通则草案(一)公开征求意见的通知 [S]. 2018.
- [3] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [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): 2078-2080.
- [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] 王赵, 陈佳, 林彤, 等. 中药及其制剂辐射杀菌现状调研及监管建议 [J]. 中国药学杂志, 2015, 50(4): 314-316.
- [7] 白洁, 迟玉明, 金红宇, 等. 《中药辐照灭菌技术指导原则》解读 [J]. 中成药, 2017, 39(7): 1537-1538.
- [8] 张立雯, 林玲, 林彤, 等. 龙胆和秦艽钴60辐照前后指纹图谱变化的研究 [J]. 药物分析杂志, 2015, 35(12): 2173-2180.
- [9] 张立雯, 林玲, 梁伟洪, 等. 干热、湿热、辐照对龙胆和秦艽化学成分和灭菌效果的比较研究 [J]. 中药新药与临床药理, 2016, 27(5): 692-697.
- [10] 何群, 陈光宇, 王适, 等. γ -射线辐照灭菌对四妙君逸软膏中有效成分含量和指纹图谱的影响 [J]. 中国药师, 2017, 20(3): 405-408.
- [11] 吕望, 徐放, 吴赛伟, 等. 钴60辐照对柴胡药材有效成分的影响研究 [J]. 药物分析杂志, 2017(6): 1135-1141.
- [12] 郭奕, 李春娥, 李光达. 中药原生药粉的灭菌方法及其设备选型 [J]. 机电信息, 2016, 10(29): 9-15.
- [13] 黄晓婧, 周晓英. 成都地区中药钴-60辐照情况调研报告 [J]. 中国药物评价, 2017, 34(1): 33-35.
- [14] 中药辐照灭菌技术指导原则 [S]. 2015.
- [15] 崔语涵, 安潇, 王海峰, 等. 姜黄化学成分研究 [J]. 中草药, 2016, 47(7): 1074-1078.
- [16] 羊青, 晏小霞, 王茂媛, 等. 不同产地姜黄挥发油的化学成分及其抗氧化活性 [J]. 中成药, 2016, 38(5): 1188-1191.
- [17] Chen Z, Sun D, Bi X, *et al.* Pharmacokinetic based study on “lagged stimulation” of *Curcumae Longae Rhizoma*-*Piper nigrum* couplet in their main active components metabolism using UPLC-MS-MS [J]. *Phytomedicine*, 2017, 27: 15-22.