

⁶⁰Co- γ 辐照对大黄化学成分及抗菌活性的影响

毛腾霄¹, 黄晓婧¹, 黄敏^{2*}, 陈红^{1*}, 汪洋¹

(1. 成都市药品检验研究院, 四川 成都 610045; 2. 四川省原子能研究院辐照保藏四川省重点实验室, 四川 成都 610101)

摘要: 目的 考察⁶⁰Co- γ 辐照对大黄化学成分、抗菌活性的影响。方法 唐古特大黄、掌叶大黄经5、10、20、30 kGy剂量⁶⁰Co- γ 辐照后, 采用HPLC法测定辐照前后总蒽醌、5种游离蒽醌(芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚)的含量, 管碟法检测水提物对金黄色葡萄球菌的抑制作用。结果 辐照后, 总蒽醌、游离蒽醌含量均无显著差异($P>0.05$); 当辐照剂量达到30 kGy时, 相关成分色谱峰响应增加($P<0.01$)。2种大黄水提物抑制金黄色葡萄球菌的抑菌圈直径比较, 差异无统计学意义($P>0.05$)。结论 ⁶⁰Co- γ 辐照对大黄化学成分、抗菌活性均无影响, 但在高剂量下会引起某些相关成分含量发生变化。

关键词: 大黄; ⁶⁰Co- γ 辐照; 化学成分; 抗菌活性; HPLC; 管碟法

中图分类号: R284.1

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2022)11-3724-04

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2022.11.059

大黄是蓼科植物掌叶大黄 *Rheum palmatum* L.、唐古特大黄 *Rheum tanguticum* Maxim. ex Balf. 或药用大黄 *Rheum officinale* Baill. 的干燥根和根茎^[1], 含有多种化学成分, 以蒽醌类衍生物为主。现代药理学及临床应用表明, 该药材具有抗菌消炎的作用^[2-3]。

中药材一般有一定的微生物负载, 故降低菌量是药材在生产、加工过程中的重要目标之一。⁶⁰Co- γ 灭菌法是近年流行起来的新型消毒灭菌方法, 它在常温下消毒灭菌而不破坏药材中易挥发成分及热敏性物质, 具有穿透力强、消毒均匀、快速等特点, 目前已广泛用于中药材及其制品的灭菌^[4-5]。目前, 辐照灭菌所用剂量一般参照1997年版《⁶⁰Co辐照中药灭菌剂量标准》和2015年版《中药辐照灭菌技术指导原则》要求执行, 前者规定中药原粉能接受的辐照剂量不得过6 kGy, 后者规定中药最大总体平均辐照剂量原则上不超过10 kGy。课题组前期调研发现, 在实际操作时同一次辐照可能包括几种不同的物品^[6], 为了保证辐照后卫生学指标都合格, 一般选择大剂量(10~15 kGy), 个别品种甚至达到30 kGy, 而且目前已有关于辐照引起中药化学成分变化的报道^[7-8]。本实验模拟企业常用辐照剂量, 采用HPLC法比较辐照前后大黄总蒽醌、5

种游离蒽醌(芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚)含量的变化, 再以管碟法检测辐照前后对金黄色葡萄球菌的抑制作用, 旨在为今后研究其他中药辐照工艺提供依据。

1 材料

1.1 药材 唐古特大黄、掌叶大黄均购自成都荷花池中药材市场, 经成都市药品检验研究院中药材市场质量监测研究重点实验室鉴定为正品。

1.2 试剂与药物 芦荟大黄素(批号110795-201710)、大黄酸(批号110757-201607)、大黄素(批号110756-201913)、大黄酚(批号110796-201922)、大黄素甲醚(批号110758-201817)对照品及金黄色葡萄球菌[CMCC(B)26003]均由中国食品药品检定研究院提供。抗生素检定用培养基I(含胨5g、牛肉浸出粉3g、磷酸氢二钾3g、琼脂15g、水1000 mL, pH 7.9)、胰酪大豆胨液体培养基(批号200224-21)均购自北京陆桥技术股份有限公司。0.9%无菌氯化钠溶液为自制, 灭菌后备用。

1.3 仪器 Waters 2695液相色谱仪(美国Waters公司); AEG 220电子天平(日本岛津公司); ZY-300IV多功能微生物自动测量分析仪(北京先驱威锋技术开发公司)。

收稿日期: 2021-02-24

基金项目: 四川省科技计划重点研发项目(2020YFS0570); 成都市龙泉驿区科技项目(LQXKJ-KJXM-2021-038); 四川省原子能研究院辐照保藏四川省重点实验室开放基金项目(FZBC2020007)

作者简介: 毛腾霄(1980—), 男, 硕士, 高级农艺师, 从事药品检验检测研究。Tel: (028) 85362197, E-mail: pzh_maotx@126.com

* **通信作者:** 黄敏(1973—), 女, 博士, 研究员, 从事食品药品加工与贮藏研究。Tel: (028) 65985217, E-mail: hm12190520@163.com

陈红(1977—), 女, 硕士, 主任药师, 从事药品、化妆品研究。Tel: (028) 85362213, E-mail: 184217019@qq.com

网络出版日期: 2021-12-24

网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/31.1368.R.20211224.0857.002.html>

2 方法

2.1 ⁶⁰Co-γ 辐照 唐古特大黄、掌叶大黄粉碎后过4号筛，分装于无菌袋中，在四川省辐照中心进行⁶⁰Co-γ 辐照，剂量设置为0、5、10、20、30 kGy（其中0 kGy是未辐照处理），分别平行处理2次。辐照完成后，立即进行各项指标检测。

2.2 总蒽醌、游离蒽醌含量测定 参照2020年版《中国药典》“大黄”项下^[9]方法处理药材，经热回流提取后过滤备用。

2.2.1 对照品溶液制备 精密称取芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚对照品适量至250 mL量瓶中，适量甲醇溶解，定容，制成分别含五者18.3、22.9、20.0、20.0、11.2 μg/mL的溶液，即得。

2.2.2 供试品溶液制备

2.2.2.1 总蒽醌 取药材粉末约0.15 g，置于具塞锥形瓶中，精密加入甲醇25 mL，称定质量，加热回流1 h，放冷，甲醇补足减失的质量，摇匀，滤过，精密量取续滤液5 mL至烧瓶中，挥去溶剂，加8%盐酸10 mL，超声处理2 min，再加三氯甲烷10 mL，加热回流1 h，放冷，置于分液漏斗中，少量三氯甲烷洗涤容器，并入分液漏斗中，分取三氯甲烷层，酸液再用三氯甲烷提取3次，每次10 mL，合并三氯甲烷液，减压回收溶剂至干，残渣加甲醇溶解，转移至10 mL量瓶中，加甲醇至刻度，摇匀，滤过，取续滤液，即得。

2.2.2.2 游离蒽醌 取药材粉末约0.5 g，精密称定，置于具塞锥形瓶中，精密加入甲醇25 mL，称定质量，加热回流1 h，放冷，甲醇补足减失的质量，摇匀，滤过，取续滤液，即得。

2.2.3 色谱条件 Waters Bridge 十八烷基硅烷键合硅胶填料色谱柱（4.6 mm×250 mm，5 μm）；流动相甲醇-0.1%磷酸（85：15）；体积流量1.0 mL/min；柱温30℃；检测波长254 nm；进样量10 μL。

2.3 抗菌活性研究

2.3.1 水提物制备 取药材50 g至三角瓶中，加500 mL水，精密称定质量，浸泡30 min后煎煮，煮沸后用文火再煮40 min，放冷，称定质量，加水补足减失的质量，3 000 r/min离心5 min，收集上清液并记录其体积，旋转浓缩至1 g/mL，即得。

2.3.2 试验菌液制备 取金黄色葡萄球菌标准菌株适量，接种至胰酪大豆胨液体培养基中，在33℃下培养20 h，0.9%无菌氯化钠溶液稀释至1×10⁴ cfu/mL，即得。

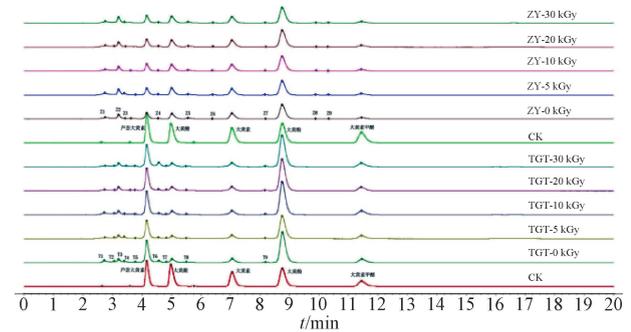
2.3.3 测定方法 参照2020年版《中国药典》中的“抗生素微生物检定法”制备双碟，采用管碟法测定。取未辐照水提物，无菌水梯度稀释成不同质量浓度，各质量浓度之间的剂距为0.8。测定1批药材时，取双碟6只，各碟内间隔的3只牛津杯中滴滴未辐照的水提物，另3只牛津杯中滴滴同一剂量辐照后的水提物，在36℃下培养16 h，取出，游标卡尺测定抑菌圈直径，取平均值，以质量浓度为横坐标（X），抑菌圈直径为纵坐标（Y）进行回归，拟合

量效关系方程。

2.4 统计学分析 通过SPSS 22.0软件进行处理，组间比较采用配对样本t检验。P<0.05表示差异具有统计学意义。

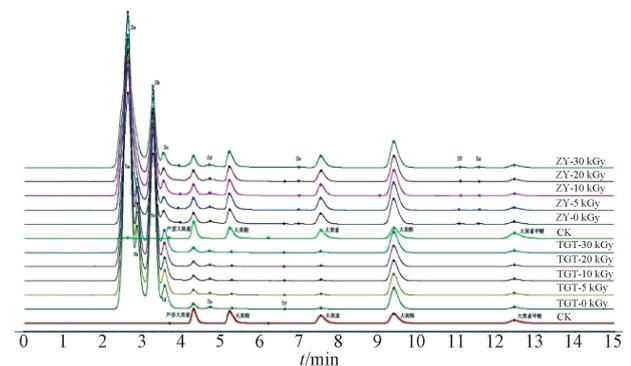
3 结果

3.1 HPLC 指纹图谱 将总蒽醌、游离蒽醌含量的色谱图导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统（2012年版）》，工作状态选“分析检验”，以未辐照（0 kGy）药材色谱图为参照，设定多点校正、时间宽为0.1进行全谱峰匹配，结果见图1~2，相似度见表1。由此可知，4个辐照剂量处理后与未辐照时2种蒽醌HPLC指纹图谱的相似度均大于0.995，两者峰高和峰形也无明显差异。



注：ZY-30 kGy 表示掌叶大黄经30 kGy 剂量辐照，TGT-30 kGy 表示唐古特大黄经30 kGy 剂量辐照，以此类推。CK表示参照。

图1 辐照前后总蒽醌 HPLC 指纹图谱



注：ZY-30 kGy 表示掌叶大黄经30 kGy 剂量辐照，TGT-30 kGy 表示唐古特大黄经30 kGy 剂量辐照，以此类推。CK表示参照。

图2 辐照前后游离蒽醌 HPLC 指纹图谱

表1 相似度测定结果

样品	相似度	
	总蒽醌	游离蒽醌
TGT-0 kGy	1.000	1.000
TGT-5 kGy	0.999	1.000
TGT-10 kGy	0.999	1.000
TGT-20 kGy	0.997	1.000
TGT-30 kGy	0.995	1.000
ZY-0 kGy	1.000	1.000
ZY-5 kGy	0.995	1.000
ZY-10 kGy	0.999	1.000
ZY-20 kGy	0.997	1.000
ZY-30 kGy	0.997	1.000

注：TGT-0 kGy 表示唐古特大黄未辐照，ZY-0 kGy 表示掌叶大黄未辐照，以此类推。

3.2 总蒽醌、游离蒽醌含量 由表2可知,辐照前后总蒽醌、游离蒽醌含量比较,差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

表2 辐照前后总蒽醌、游离蒽醌含量及抑菌圈直径测定结果

批号	辐照剂量/kGy	总蒽醌/(mg·g ⁻¹)					游离蒽醌/(mg·g ⁻¹)					抑菌圈直径/mm
		芦荟 大黄素	大黄酸	大黄素	大黄酚	大黄素 甲醚	芦荟 大黄素	大黄酸	大黄素	大黄酚	大黄素 甲醚	
TGT1	0	5.79	1.28	2.09	11.45	2.58	0.40	0.12	0.13	2.14	0.37	17.82
	5	5.93	1.16	1.99	10.67	2.37	0.39	0.12	0.13	2.14	0.37	17.80
	10	6.06	1.34	2.13	12.52	2.69	0.38	0.10	0.12	2.07	0.35	17.80
	20	6.16	1.48	2.08	12.17	2.65	0.38	0.11	0.13	2.15	0.37	17.78
	30	5.97	1.43	2.10	12.21	2.63	0.37	0.11	0.13	2.15	0.37	17.82
TGT2	0	5.95	1.33	2.11	11.94	2.66	0.41	0.13	0.13	2.13	0.25	17.82
	5	6.05	1.27	2.05	10.85	2.49	0.39	0.13	0.13	2.16	0.36	17.84
	10	5.94	1.29	2.08	12.69	2.62	0.42	0.12	0.12	2.09	0.35	17.82
	20	6.12	1.40	2.12	12.50	2.52	0.41	0.12	0.13	2.13	0.36	17.84
	30	5.88	1.35	2.17	12.09	2.75	0.35	0.11	0.12	2.14	0.37	17.80
ZY1	0	1.64	2.34	2.75	5.35	0.94	0.94	1.62	1.40	3.84	0.43	16.50
	5	1.79	2.59	2.94	5.43	0.98	1.00	1.72	1.52	3.69	0.47	16.80
	10	1.77	2.39	3.09	5.61	1.01	0.94	1.63	1.44	3.81	0.45	16.64
	20	1.99	2.62	3.29	6.49	1.09	0.93	1.59	1.44	3.77	0.44	16.56
	30	1.84	2.51	3.01	5.99	1.01	0.97	1.67	1.48	3.85	0.46	16.60
ZY2	0	1.58	2.21	2.88	5.28	0.98	0.95	1.61	1.42	3.87	0.46	16.62
	5	1.62	2.42	3.06	5.32	1.01	0.98	1.68	1.55	3.74	0.45	16.62
	10	1.71	2.32	3.13	5.36	1.04	0.96	1.61	1.48	3.71	0.43	16.58
	20	1.85	2.36	3.42	5.49	1.06	0.97	1.56	1.43	3.81	0.44	16.64
	30	1.72	2.42	2.95	5.81	1.05	0.96	1.64	1.47	3.82	0.45	16.66

注: TGT为唐古特大黄, ZY为掌叶大黄。各成分含量为2个数据的平均值, 抑菌圈直径为18个数据的平均值。

3.3 相关成分峰面积 在总蒽醌 HPLC 指纹图谱中, 唐古特大黄可标定出9个共有峰, 分别是 T1~T9, 而掌叶大黄可标定出9个共有峰, 分别是 Z1~Z9; 游离蒽醌 HPLC 指纹图谱中, 唐古特大黄可标定出6个共有峰, 分别是 Ta~Tf, 而掌叶大黄可标定出5个共有峰, 分别是 Za~Ze。将总蒽醌 HPLC 指纹图谱中相关成分峰面积进行对数转换后采用配对样本 *t* 检验, 结果见表3。由此可知, 当辐照剂量达到30 kGy时, 唐古特大黄 T6 峰与0、5、10、20 kGy 剂量时比较具有显著差异 ($P<0.01$), 而0、5、10、20 kGy 剂量之间无显著差异 ($P>0.05$); 掌叶大黄 Z2 峰与0、5、10、20 kGy 剂量时比较具有显著差异 ($P<0.01$), 而0、5、10、20 kGy 剂量之间无显著差异 ($P>0.05$)。同法处理游离蒽醌 HPLC 指纹图谱, 相关成分峰面积见表4, 可知各辐照剂量处理后其峰面积无显著差异 ($P>0.05$)。

3.4 抗菌活性 辐照前唐古特大黄、掌叶大黄水提物的抑菌圈直径见图3, 量效关系方程分别为 $Y=0.447X+16.45$ ($R^2=0.985$)、 $Y=0.507X+15.69$ ($R^2=0.996$), 均在0.08~0.25 g/mL 范围内线性关系良好。在上述量效关系方程中选择质量浓度为0.16 g/mL, 测定辐照前后抑菌圈直径, 结果见表2, 可知均无显著差异 ($P>0.05$)。

4 讨论与结论

辐照是一种有效的灭菌方法, 虽然国家规定了中药材的辐照剂量, 但近年来发现实际运用中并未严格遵守。已有关于药物经较高剂量辐照后产生降解产物的报道^[10-11]。由于药材辐照剂量随意扩大具有普遍性, 故本实验考察了

在当前常用剂量下对大黄有效成分、相关成分以及抗菌活性的影响。以期为辐照应用研究提供相关数据和依据。

大黄辐照前后总蒽醌和游离蒽醌 HPLC 指纹图谱相关数据经统计分析表明, 主要成分芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚含量未发生变化 ($P>0.05$)。

表3 总蒽醌 HPLC 指纹图谱中相关成分峰面积测定结果

品种	杂质峰	辐照剂量/kGy				
		0	5	10	20	30
唐古特大黄	T1	5.04	4.99	4.93	4.88	4.91
	T2	4.63	4.58	4.70	4.61	4.60
	T3	5.00	4.99	5.02	5.04	5.04
	T4	4.86	4.92	4.71	4.68	4.78
	T5	4.43	4.44	4.41	4.56	4.51
	T6	4.85	4.74	4.80	4.71	5.23**
	T7	4.32	4.32	4.32	4.45	4.43
	T8	4.20	4.17	4.18	4.44	4.45
	T9	4.40	4.38	4.44	4.47	4.46
掌叶大黄	Z1	5.05	5.04	5.02	5.06	5.01
	Z2	5.19	5.19	5.18	5.15	5.30▲▲
	Z3	4.62	4.67	4.62	4.67	4.61
	Z4	4.49	4.51	4.39	4.58	4.53
	Z5	4.71	4.61	4.65	4.70	4.69
	Z6	4.03	4.06	4.08	4.16	4.10
	Z7	3.99	4.09	4.04	4.09	4.02
	Z8	3.91	3.93	4.01	4.08	3.94
	Z9	3.78	3.83	3.93	3.95	3.84

注: 与唐古特大黄0、5、10、20 kGy 辐照剂量组比较, ** $P<0.01$; 与掌叶大黄0、5、10、20 kGy 辐照剂量组比较, ▲▲ $P<0.01$ 。

表 4 游离蒽醌 HPLC 指纹图谱中相关成分峰面积测定结果

品种	杂质峰	辐照剂量/kGy				
		0	5	10	20	30
唐古特大黄	Ta	7.37	7.38	7.35	7.46	7.35
	Tb	6.74	6.74	6.72	6.73	6.69
	Tc	7.12	7.12	7.09	7.11	7.09
	Td	6.26	6.02	6.25	6.26	6.24
	Te	5.28	5.28	5.23	5.24	5.21
	Tf	3.72	3.76	3.80	3.78	3.75
掌叶大黄	Za	7.20	7.25	7.24	7.23	7.24
	Zb	6.74	6.77	6.76	6.74	6.74
	Zc	6.07	6.04	6.09	6.06	6.08
	Zd	5.50	5.51	5.48	5.48	5.27
	Ze	4.30	4.31	4.27	4.30	4.27
	Zf	4.57	4.61	4.49	4.57	4.51
	Zg	4.46	4.58	4.41	4.46	4.42



注：数字为各抑菌圈对应的水提物质量浓度。

图 3 水提物抑菌圈直径

但当辐照剂量达到 30 kGy 时，总蒽醌含量指纹图谱上唐古特大黄和掌叶大黄分别有一处有关成分峰响应极显著增大 ($P < 0.01$)，说明辐照剂量增加会引起相关成分发生变化，值得进一步研究。

金黄色葡萄球菌是引起人类组织器官感染的重要致病菌^[12-14]，据文献报道，芦荟大黄素、大黄酸、大黄素和大黄素甲醚均对其有抑制作用^[15-16]。本研究在前期药敏试验时发现金黄色葡萄球菌对大黄水提物最敏感，这与前人报道一致^[17-18]，故选为抗菌活性试验菌株。根据 2020 年版《中国药典》“中药生物活性测定指导原则”，本研究采用剂量梯度试验，找到了药物浓度与抑菌活性量效关系的线性关系范围，从而确定了可作为比较辐照前后活性变化的浓度点。测定结果表明，在所选辐照剂量下，大黄抗金黄色葡萄球菌活性未发生变化。

由于辐照灭菌应用于中药的历史短，基础研究尚需不断完善，本研究仅考察了辐照前后大黄主要化学成分含量、相关成分和抗菌活性的变化，今后还应进一步对辐照敏感的成分进行鉴定分析，在稳定性等方面展开研究以保证用药安全。

参考文献：

[1] 李 芸, 苗小楼, 吴平安, 等. 大黄不同品种不同产地加

工品的蒽醌含量比较[J]. 药物分析杂志, 2012, 32(12): 2257-2261.

[2] 尹长江, 路国兵, 赵长祺, 等. 常见抗菌中草药对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的抑菌作用[J]. 时珍国医国药, 2013, 24(6): 1380-1381.

[3] 刘美艳, 邓 赞, 吴 兵, 等. 芦荟大黄素金属配合物的抗菌活性研究[J]. 中国抗生素杂志, 2020, 45(12): 1221-1226.

[4] 林 彤, 毕福钧, 吕渭升, 等. 中药的辐照灭菌现状与监管[J]. 中国药学杂志, 2019, 54(17): 1442-1447.

[5] 胡 婷, 高智强, 马永生, 等. X 射线辐照处理对甘草三萜类及黄酮类有效成分含量的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(17): 17-21.

[6] 黄晓婧, 周晓英. 成都地区中药钴-60 辐照情况调查报告[J]. 中国药物评价, 2017, 34(1): 33-35.

[7] 车尔玺, 丘鹰鲲, 李梅丽, 等. 肚液散 GC 指纹图谱建立及⁶⁰Co-γ 辐照灭菌对 4 种成分的影响[J]. 中成药, 2019, 41(12): 2853-2857.

[8] 黄义雯, 朱 芹.⁶⁰Co-γ 射线辐照灭菌对沉香化气胶囊中 6 个挥发性成分的影响[J]. 药物分析杂志, 2020, 40(2): 352-359.

[9] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2020 年版一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020.

[10] 阮 健, 权洪远, 矫春丽, 等.⁶⁰Co-γ 射线辐照对通脉颗粒中 4 个成分的影响研究[J]. 中国药师, 2018, 21(10): 1766-1769.

[11] 李汁萍. 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.

[12] 苗晓光, 丁延超. 老年糖尿病脑梗死患者院内肺部感染金黄色葡萄球菌耐药性和毒力分析[J]. 中国卫生检验杂志, 2021, 31(17): 2105-2108.

[13] 刘卫平, 任 伟, 王 萌, 等. 某医院住院患者耐甲氧西林金黄色葡萄球菌流行特征和耐药性分析[J]. 中国消毒学杂志, 2021, 38(11): 846-849.

[14] 刘志伟, 王冬至, 卜 颖, 等. 神经外科术后耐甲氧西林金黄色葡萄球菌导致脑膜炎的风险因素研究[J]. 国际检验医学杂志, 2021, 42(20): 2468-2472.

[15] 韩慧芬. 多元回归分析大黄不同炮制品中蒽醌与抑菌活性相关性[J]. 中医药导报, 2021, 27(1): 65-68.

[16] 黄干荣, 李晓华, 黄衍强, 等. 大黄素等提取物对耐药性大肠杆菌生物膜形成的影响[J]. 中成药, 2013, 35(12): 2602-2605.

[17] 戴碧鑫, 董碧莲, 蔡延渠, 等. 大黄原药材、药渣的总蒽醌含量测定及体外抗菌活性研究[J]. 亚太传统医药, 2020, 16(8): 20-24.

[18] 覃 静, 祖敬芝, 罗 沙, 等. 大黄酸抗耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的抗菌机制[J]. 微生物学通报, 2021, 48(6): 2111-2117.