

生、炒酸枣仁水提液指纹图谱对比研究

刘晓^{1,2,3}, 朱晓钗^{1,2,3}, 谢莉^{1,2,3}, 朱小芳^{1,2,3}, 蔡宝昌^{1,2,3,4}

(1.南京中医药大学药学院,江苏南京 210023;2.国家教育部中药炮制规范化及标准化工程研究中心,江苏南京 210023;3.江苏省中药炮制重点实验室,江苏南京 210023;4.南京海昌中药集团有限公司,江苏南京 210061)



蔡宝昌

1952年生,男,药学博士、教授、博士研究生导师,国家教育部中药炮制规范化及标准化工程研究中心、国家级中药炮制技术传承基地负责人,世界中医药学会联合会中药饮片质量专业委员会会长、全国制药装备标准化技术委员会中药炮制机械专业委员会会长、中国医药物资协会中药材和饮片专业委员会会长,获全国“百千万人才工程”国家级人选、国家级有突出贡献的中青年专家、中医药高等学校教学名师称号,并享受国务院专家津贴。

摘要:目的 分别建立生、炒酸枣仁水提液的指纹图谱,拟从整体水平表征酸枣仁炒制前后化学成分发生的变化,同时以此指导酸枣仁的炒制工艺优化。**方法** 采用 Hypersil GOLD C₁₈ 色谱柱,0.1% 甲酸水溶液-乙腈为流动相进行梯度洗脱,体积流量 1 mL/min,检测波长 280 nm,分别测定不同产地不同批次生、炒酸枣仁水提液的指纹图谱,利用中药指纹图谱相似度评价系统(2012A 版)进行相似度比较,同时使用主成分分析方法对 2 种酸枣仁样品分别进行模式识别。**结果** 同时建立了生、炒酸枣仁的水提液指纹图谱共有模式,确定了生酸枣仁水提液样品中的 10 个共有峰和炒酸枣仁水提液样品中的 12 个共有峰,并利用模式识别方法对生、炒酸枣仁加以区分。对比标准图谱,确定在 130~150 ℃ 的炒制温度范围内,酸枣仁炒制最佳时间为 7 min。**结论** 采用指纹图谱结合模式识别的方式能够有效区分生、炒酸枣仁水提液样品,同时为酸枣仁的质量评价与炮制工艺优化提供参考。

关键词:酸枣仁;指纹图谱;炮制工艺;主成分分析

中图分类号:R284 文献标志码:A 文章编号:1672-0482(2019)05-0585-05

DOI:10.14148/j.issn.1672-0482.2019.0585

引文格式:刘晓,朱晓钗,谢莉,等.生、炒酸枣仁水提液指纹图谱对比研究[J].南京中医药大学学报,2019,35(5):585-589.

Comparative Study on Fingerprints of Decoctions of Crude and Parched *Ziziphi Spinosa* Semen

LIU Xiao^{1,2,3}, ZHU Xiao-chai^{1,2,3}, XIE Li^{1,2,3}, ZHU Xiao-fang^{1,2,3}, CAI Bao-chang^{1,2,3,4}

(1.College of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing, 210023, China; 2. Engineering Center of State Ministry of Education for Standardization of Chinese Medicine Processing, Nanjing, 210023, China; 3. Key Laboratory of State Administration of TCM for Standardization of Chinese Medicine Processing, Nanjing, 210023, China; 4. Nanjing Haichang Chinese Medicine Group Corporation, Nanjing, 210061, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the change of chemical compounds in *Ziziphi spinosa* semen (ZSS) caused by stir-frying by developing HPLC fingerprints of decoction samples of crude and parched ZSS, and to provide references for ZSS stir-frying processing optimization. **METHODS** Hypersil GOLD C₁₈ column (250 mm×4.6 mm, 5 μm) was used with 0.1% formic acid in water (v/v) - acetonitrile as the elution system in gradient elution mode. The flow rate was 1.0 mL/min and the detective wavelength was 280 nm. The fingerprints for decoctions of crude and parched ZSS to evaluate their qualities were performed by

收稿日期:2018-06-27

基金项目:国家自然科学基金(81573603);江苏省高等学校自然科学研究重大项目(17KJA360006);江苏省“333 工程”资助项目;江苏省研究生科研创新计划项目(KYCX18_1630)

第一作者:刘晓,女,副研究员,E-mail:liuxiao04_0@163.com

通信作者:蔡宝昌,男,教授,博士生导师,主要从事中药炮制机理与炮制工艺规范化研究,E-mail:bccai@126.com

Traditional Chinese Medicine Fingerprint Similarity Evaluation System (2012A edition). Meanwhile, principal component analysis, as a method of pattern recognition, was applied to give an overall evaluation. **RESULTS** The common modes of HPLC fingerprint for crude and parched ZSS were set up. There were 10 common peaks in the fingerprints for the crude and 12 common peaks for the parched. **CONCLUSION** The combination of fingerprints and chemical pattern recognition is an effective method for the distinction between crude and parched ZSS, which will provide meaning references for quality evaluation and stir-frying processing optimization of ZSS.

KEY WORDS: *Ziziphi spinosae* semen; fingerprint; processing; principal component analysis

酸枣仁来源于鼠李科植物酸枣 *Ziziphus jujuba* Mill. var. *spinosa* (Bunge) Hu ex H. F. Chou 的干燥成熟种子,其味甘酸、性平,归心、肝、胆经,具有养心益肝、安神、敛汗之功,是治疗心肝血虚所致心悸、失眠之要药^[1]。现代研究表明,酸枣仁中主要化学成分包括脂肪油、皂苷类、黄酮类、生物碱类和三萜类等^[2],主要药理作用有镇静催眠、抗惊厥、改善心肌缺血、保护神经系统等^[3]。

中药炮制界有“逢子必炒”理论,即诸子类的中药均需经炒制后方可入煎,以便临床使用和增强疗效,其中“子”泛指种子类及部分果实类的中药材^[4]。酸枣仁作为典型的种子类中药,其炮制方法历经多朝发展,目前最主流的方法为清炒。现代临床应用经验与药理实验证实生、炒酸枣仁均具有一定的镇静催眠作用,且炒制后药效增强,这亦符合炮制理论中的“生效熟增”学说^[5]。酸枣仁在经炒制后可能由以下 2 种途径产生了“生效熟增”的变化:①质地改变,利于粉碎,使得有效成分更易煎出;②化学成分发生含量或/和种类的变化,产生新的有效成分。两者无论是哪一种或是皆有,炒制后酸枣仁中化学成分的变化是引起药效变化的重要因素^[6]。鉴于已有的相关文献与标准中化学成分测定指标单一,缺乏整体性、普遍性地反映酸枣仁中复杂成分在炒制前后差异变化的表征模式,本研究拟通过 HPLC 法结合主成分分析(PCA)等识别手段,对所收集的不同产地、多批次的生、炒酸枣仁进行测定,以期从宏观层面发现酸枣仁炒制前后化学成分发生的变化,为“逢子必炒”理论提供科学依据。在此基础上,将 130~150 ℃ 条件下炒制不同时间的炒酸枣仁指纹图谱与标准指纹图谱比较,确定炒制的最佳时间,为酸枣仁的炒制工艺优化提供参考。

1 材料

1.1 仪器

2695 型高效液相色谱系统(美国 Waters 公司);AIBOTE 电热套(南京予华仪器设备有限公司);高速万能粉碎机(天津市泰斯特仪器有限公

司)。

1.2 试剂

色谱级甲醇、乙腈购自上海 ANPEL 实验器材有限公司;色谱级甲酸购自南京荣华科学器材公司;水为超纯水;其余试剂均为分析纯。

对照品斯皮诺素(批号:S-043-150626,纯度>98%)、6'-阿魏酰斯皮诺素(批号:A-011-170731,纯度>98%)购于成都瑞芬思有限公司;山茶苷 B(批号:170313-080,纯度>98%)、阿魏酸(批号:17022303,纯度>98%)购于南京金益佰生物科技有限公司。

1.3 酸枣仁样品

市售酸枣仁来源于 3 个产地的生、炒酸枣仁各 10 个批次,采购于安徽铜陵药材饮片公司,经南京中医药大学陈建伟教授鉴定为鼠李科植物酸枣的干燥成熟种子,依 2015 版《中国药典》酸枣仁项下测定均符合规定^[1],样品保存于南京中医药大学中药炮制重点实验室。生、炒酸枣仁样品的详细信息见表 1。

自制炒酸枣仁:称取市售山东产地的生酸枣仁饮片 50 g(批号:20160616),置预热适度的炒制容器中,保持药温为 130~150 ℃ 范围内,分别炒制 2、3、5、7、10、15 min,记为 Z1、Z2、Z3、Z4、Z5、Z6,取出放凉。

2 方法与结果

2.1 供试品溶液制备

参照临床煎煮工艺,称取酸枣仁粉末(过 4 号筛)约 10 g,加入 10 倍量水浸泡 30 min 后武火煮沸,文火保持微沸 30 min,滤过。药渣再加入 8 倍量水按相同方法煎煮,将煎液滤过,合并 2 次滤液,得酸枣仁水提液。

取 1 mL 酸枣仁水提液,12 000 r/min 离心 5 min,取上清液过 0.45 μm 微孔滤膜,得供试品溶液。

2.2 混合对照品溶液制备

分别精密称取斯皮诺素、6'-阿魏酰斯皮诺素、山茶苷 B、阿魏酸对照品适量,加入甲醇溶解并稀

释,摇匀,得到浓度分别为0.141、0.173、0.163、0.174 mg/mL的混合对照品溶液。

表1 酸枣仁样品来源信息

编号	批号	产地	编号	批号	产地
S1	20160716	山东	C1	20160716	山东
S2	20160808	山东	C2	20160808	山东
S3	20160606	山东	C3	20160606	山东
S4	20160616	山东	C4	20160616	山东
S5	20160710	山东	C5	20160710	山东
S6	20160720	陕西	C6	20160720	陕西
S7	20160810	陕西	C7	20160810	陕西
S8	20160902	河北	C8	20160902	河北
S9	20160910	河北	C9	20160910	河北
S10	20160820	河北	C10	20160820	河北

注:S为生品;C为炒品。

2.3 色谱条件

Hypersil GOLD C₁₈ 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);柱温:25 °C;流速:1 mL/min;0.1%甲酸水溶液(A)-乙腈(B)系统进行梯度洗脱,程序如下:0~1 min,5%~8%B;1~5 min,8%~10%B;5~9 min,10%~14%B;9~11 min,14%~15%B;11~12 min,15%~18%B;12~14 min,18%B;14~19 min,18%~23%B;19~27 min,23%~28%B;27~30 min,28%B;30~40 min,28%~100%B;进样量:10 μL;检测波长:280 nm。

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度实验 取同一批炒酸枣仁样品,按照2.1项下制备供试品溶液,按照2.3项下条件,于24 h内连续进样6次,以斯皮诺素为参考峰,选择10个主要峰进行比较,结果表明,10个主要峰相对保留时间RSD均小于0.8%,相对峰面积RSD均小于1.3%,结果表明仪器的精密度符合要求。

2.4.2 重复性实验 取同一批炒酸枣仁样品,按照2.1项下平行制备6份供试品溶液,按照2.3项下条件进样,以斯皮诺素为参考峰,选择10个主要峰进行比较,结果表明,10个主要峰相对保留时间RSD均小于1.0%,相对峰面积RSD均小于3.0%,结果表明该方法的重复性符合要求。

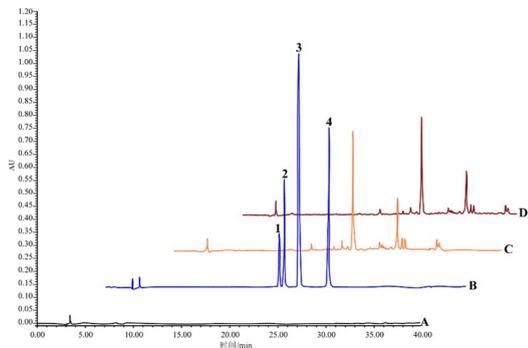
2.4.3 稳定性实验 取同一份炒酸枣仁供试品溶液,分别于0、2、4、6、8、12、24 h按照2.3项下条件进样,以斯皮诺素为参考峰,选择10个主要峰进行比较,结果表明,供试品溶液在24 h内稳定性符合要求。

2.5 指纹图谱分析与最佳炒制时间确定

2.5.1 市售生、炒酸枣仁指纹图谱的建立及相似度分析 分别取3个产地各10个批次市售生、炒酸枣仁饮片与自制不同时间点炒酸枣仁饮片,按照2.1项下要求制备供试品溶液,将供试品溶液与混合对照品溶液,分别按照2.3项下条件进样测定,得到混合对照品溶液、生酸枣仁以及炒酸枣仁水提液HPLC指纹图谱(图1)。

将生、炒酸枣仁水提液的指纹图谱导入到中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012A版)中,分别生成市售生酸枣仁水提液的指纹图谱(图2),相似度系统匹配数据得出10个共有峰;市售炒酸枣仁水提液的指纹图谱(图3),相似度系统匹配数据得出12个共有峰。生、炒酸枣仁水提液指纹图谱中均以斯皮诺素为参照峰计算共有峰的相对保留时间,生、炒酸枣仁水提液指纹图谱共有峰信息见表2;相似度评价系统采用平均数计算生、炒酸枣仁水提液的指纹图谱的相似度,其相似度结果见表3。

将由生、炒酸枣仁指纹图谱得到的共有峰的相对峰面积作为变量,采用Simcal4.1统计分析软件对原始数据进行标准化处理后进行PCA,结果见图4。如图显示,10个批次的生酸枣仁差异较大,较为分散,经过炒制后,差异缩小,生酸枣仁与炒酸枣仁能够明显分为两类。同时,自制炒酸枣仁样品能够与市售生酸枣仁分为两类,与市售炒酸枣仁归为一类。观察6个不同炒制时间下的炒酸枣仁样品可以发现,随着炒制时间的延长,自制样品向市售的炒酸枣仁样品逐渐靠近,到达7 min时最为接近,但是,随着炒制时间的继续增加,Z5及Z6样品又逐渐偏离市售样品。



注:A.空白溶剂;B.混合对照品溶液;C.生酸枣仁;D.炒酸枣仁;
1.山茶苷B;2.斯皮诺素;3.阿魏酸;4.6'-阿魏酰斯皮诺素

图1 空白、混合对照品溶液以及生、炒酸枣仁水提液指纹图谱

表 2 生、炒酸枣仁水提液指纹图谱共有峰保留时间及峰面积

No	保留时间/ min	生品	相对保留 时间	峰面积	炒品	相对保留 时间	峰面积
1	7.17	—			+	0.39	146.56
2	10.07	—			+	0.54	169.26
3	12.37	+	0.67	177.43	+	0.67	130.96
4	13.39	+	0.72	3 303.93	+	0.72	3 196.21
5	16.37	+	0.88	249.49	+	0.88	406.26
6	16.69	+	0.90	367.96	+	0.90	539.80
7	17.89	+	0.97	3 014.46	+	0.95	4 276.65
8	18.45	+	1.00	336.08	+	1.00	222.58
9	20.02	+	1.09	266.91	+	1.08	488.78
10	22.48	+	1.21	1 455.48	+	1.21	1 937.57
11	23.17	+	1.25	1 455.49	+	1.25	444.88
12	23.61	+	1.27	311.35	+	1.27	392.59

注：—表示未检测到；+表示检测到。

表 3 生、炒酸枣仁水提液指纹图谱相似度计算结果

编号	相似度	编号	相似度
S1	0.862	C1	0.894
S2	0.931	C2	0.725
S3	0.876	C3	0.983
S4	0.892	C4	0.979
S5	0.555	C5	0.899
S6	0.952	C6	0.966
S7	0.951	C7	0.989
S8	0.480	C8	0.966
S9	0.833	C9	0.846
S10	0.697	C10	0.955

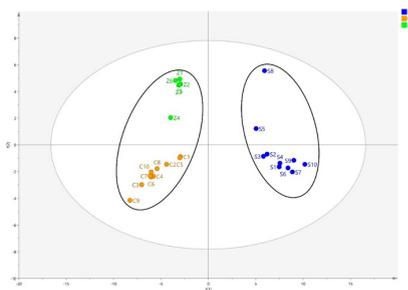


图 4 生、炒酸枣仁水提液样品 PCA 得分图

2.5.2 最佳炒制时间的确定 将炒酸枣仁水提液标准指纹图谱(相似度为 1)与炒制不同时间的酸枣仁水提液指纹图谱进行相似度计算,发现炒制 7 min 的酸枣仁水提液指纹图谱与标准图谱最为接近(表 4),从而确定在 130~150 °C 的炒制温度范围内,酸枣仁的炒制时间应该控制为 7 min。

表 4 炒制不同时间酸枣仁样品与标准图谱相似度计算结果

编号	相似度
Z1	0.912
Z2	0.912
Z3	0.941
Z4	0.955
Z5	0.928
Z6	0.938

3 讨论

本实验建立了不同产地、不同批次生、炒酸枣仁水提液的指纹图谱并进行了相似度分析,发现炒制对酸枣仁中化学成分的影响。中药临床应用多以汤剂为主,而以往研究中通常采用有机溶剂提取的方式使得其研究结果为临床使用所提供的参考具有局限性^[7-8],为了更加贴近临床使用习惯,本文采用水煎煮的方式制备样品,使得研究结果能够更加贴切地为临床提供参考。

指纹图谱结果表明不同产地的生酸枣仁之间存在较大差异,但是通过 PCA 后发现:经炒制后,不同产地的酸枣仁之间的差异缩小,聚为一类。现代化学成分研究结果表明酸枣仁经炒制后总黄酮、总皂苷的含量有所上升^[9-10],这些现象均提示炒制对于酸枣仁的化学成分有显著影响。

古今炮制界一直存在“逢子必炒”理论,其中炒制多以文武火为主,温度多控制在 130~200 °C,炒制程度多为观察药材的性状、气味为主^[11-13]。综合考虑实验操作与生产实际,本实验炒制温度控制在 130~150 °C,并采用标准指纹图谱与炒制不同时间的酸枣仁样品的指纹图谱进行相似度对比,进而得

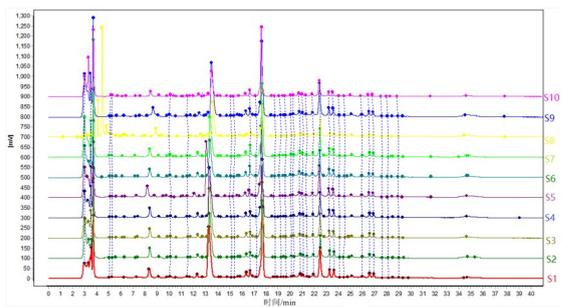


图 2 生酸枣仁水提液指纹图谱

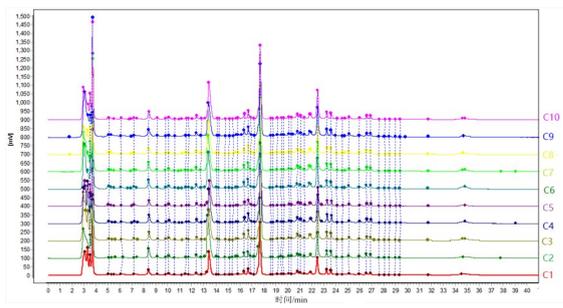


图 3 炒酸枣仁水提液指纹图谱

出在 130~150 °C 温度条件下的最佳炒制时间,为酸枣仁的炒制工艺优化提供参考。同时,PCA 结果显示,不同产地的生酸枣仁经炒制后能够缩小其产地差异,靠拢聚类,因此后续将更多产地、更多批次的生酸枣仁在优选的炒制条件下进行炒制,以期发现炒制条件对不同产地样品的适用性将成为制定炒制工艺的必要条件。指纹图谱作为中药表征的重要技术手段具有宏观性和整体性的优势,基于此来优化和确定中药的炮制工艺更加符合中药多成分协同发挥作用的用药特点,相比于单纯专注于一种或几种指标性成分,前者更加贴切实际和具有指导意义。“逢子必炒”炮制理论中有“生效熟增”的炮制目的学说,本实验通过指纹图谱结合 PCA 的手段整体表征酸枣仁经炒制后的化学成分变化,为酸枣仁炒制后可能发生的药效变化提供化学基础与理论依据。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中国药典:一部[S]. 北京:中国医药科技出版社, 2015.
- [2] 刘朋朋. 酸枣仁化学成分及其四种皂苷含量测定研究[D]. 北京:北京中医药大学, 2013.
- [3] KE Z, ZHANG X, CAO Z, et al. Drug discovery of neurodegenerative disease through network pharmacology approach in herbs[J]. *Biomed Pharmacother*, 2016, 78: 272-279.
- [4] 郭建民. “逢子必炒”之探索[J]. *贵阳中医学院学报*, 1994, 16(3): 59-60.
- [5] 翟旭峰, 肖小春, 娄勇军, 等. 生酸枣仁及其炮制品镇静催眠作用及对失眠大鼠脑电图的影响[J]. *中药药理与临床*, 2015, 31(6): 94-97.
- [6] 贾天柱. 再论中药生熟的变化与作用[J]. *中成药*, 2006, 28(7): 984-986.
- [7] NIU C, ZHANG J. Quantitative analysis and chromatographic fingerprinting of the semen zizyphi spinosae by ultra-high-performance liquid chromatography coupled with diode-array detector[J]. *J Sep Sci*, 2011, 34(21):2989-2996.
- [8] 戎欣玉, 刘魁, 李勇, 等. 酸枣仁药材的 HPLC 指纹图谱研究[J]. *河北师范大学学报(自然科学版)*, 2009, 33(3): 347-351.
- [9] 李晓东, 杨培民, 齐立红. 酸枣仁炮制前后有效成分的比较分析[J]. *山东中医杂志*, 1999, 18(5): 33-34.
- [10] 李铮, 任爽, 常增荣, 等. 中药酸枣仁饮片中 3 种成分的含量比较研究[J]. *中国新药杂志*, 2017, 26(1): 91-96.
- [11] 蔡宝昌, 张振凌. 中药炮制工程学[M]:北京:人民卫生出版社, 2014:110.
- [12] 蔡宝昌. 中药炮制学[M]. 北京:人民卫生出版社, 2006:39.
- [13] 李秋红. 菟丝子等十三味中药最佳炒制工艺研究[D]. 哈尔滨:黑龙江中医药大学, 2009.

(编辑:杨巍敏)