

猪心血炒酸枣仁的炮制工艺优选

翟莹莹, 于欢*, 龚千锋, 钟凌云, 张金莲, 张依欣
(江西中医药大学药学院, 南昌 330004)

[摘要] 目的: 优选猪心血炒酸枣仁的炮制工艺, 为地方特色炮制工艺的传承和发展提供参考。方法: 以炒制时间、炒制温度、猪心血用量为考察因素, 斯皮诺素和酸枣仁皂苷 A 含量的总评“归一值”(overall desirability, OD) 为评价指标, 采用星点设计-效应面法优选猪心血炒酸枣仁的炮制工艺并进行预测分析。结果: 最佳炮制工艺为炒制时间 6.1 min, 炒制温度 131 ℃, 猪心血用量 10% (酸枣仁药材每 100 g 拌入猪心血 10 g); 在此条件下, OD 预测值 0.830, 预测值与真实值的偏差 1.4%。结论: 采用星点设计-效应面法优选的猪心血炒酸枣仁炮制工艺稳定可行、预测性良好, 炮制工艺参数准确, 为规范地方饮片特色炮制工艺及质量标准提供参考。

[关键词] 酸枣仁; 炮制工艺; 斯皮诺素; 酸枣仁皂苷 A; 星点设计-效应面法

[中图分类号] R283; R284; R943.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)24-0046-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017240046

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170926.1009.010.html>

[网络出版时间] 2017-09-26 10:09

Optimization of Processing Technology of Ziziphi Spinosae Semen Stir-fried with Pig's Heart Blood by Central Composite Design-response Surface Methodology

ZHAI Ying-ying, YU Huan*, GONG Qian-feng, ZHONG Ling-yun, ZHANG Jin-lian, ZHANG Yi-xin
(School of Pharmacy, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize processing technology of Ziziphi Spinosae Semen stir-fried with pig's heart blood, and provide a scientific basis for the inheritance and development of local characteristic processing techniques. **Method:** Central composite design-response surface methodology was used to optimize the processing technology with overall desirability (OD) of contents of spinosin and jujuboside A as the evaluation index, stir-frying temperature, stir-frying time and the amount of pig's heart blood as factors. **Result:** The best processing technology was as following: adding 10 g of pig's heart blood into per 100 g of Ziziphi Spinosae Semen, the stir-frying temperature at 131 ℃, the stir-frying time of 6.1 min; under these conditions, the predicted value of OD was 0.830, its deviation was 1.4% from the actual value. **Conclusion:** This optimized processing technology is stable and feasible with precise processing parameters, it can provide reference for standardizing special processing technologies of local decoction pieces and their quality standards.

[Key words] Ziziphi Spinosae Semen; processing technology; spinosin; jujuboside A; central composite design-response surface methodology

酸枣仁主产于辽宁、河北、山西等地, 具有养心补肝、宁心安神、敛汗、生津的功效^[1], 属于卫生部颁布的第 1 批药食同源两用品。临床上酸枣仁主要

以生品和炒制品入药。2015 年版《中国药典》收载了酸枣仁和炒酸枣仁 2 种饮片规格, 除此之外, 酸枣仁炮制规格尚有蜜酸枣仁^[2]、焦酸枣仁^[3]、猪心血

[收稿日期] 20170611(004)

[第一作者] 翟莹莹, 在读硕士, 从事中药炮制学研究, Tel: 15797759133, E-mail: 1157912944@qq.com

[通讯作者] * 于欢, 讲师, 从事中药炮制传承、饮片质量标准与炮制机制研究, Tel: 0791-87118852, E-mail: yuhuanhebei@163.com

炒酸枣仁^[4-5]等。其中猪心血炒酸枣仁具有增强宁心安神的作用,为樟帮特色炮制品种,已被收载于 1990 年版《樟树中药炮制全书》,每用须临方炮制,其炮制工艺现仍作为一种特色炮制方法被樟树帮地方炮制沿用^[5]。《江西省中药饮片炮制规范》亦收载了猪心血炒酸枣仁炮制品,并记载“猪心血炒酸枣仁治不眠”^[4]。酸枣仁、炒酸枣仁、猪心血炒酸枣仁均有补肝、宁心、敛汗、生津的功效,均可用于虚烦不眠、惊悸多梦、体虚多汗、津伤口渴^[4-5]。猪心血炒酸枣仁配伍人参、五味子、山萸肉、甘草,用于治疗体虚自汗、烦热、口渴等疗效确切^[6]。猪心血味甘、咸,性平,无毒^[7]。清代《本草易读》称其“用作补心药良”^[8],据《食物疗法精萃》记载“猪心血味甘性寒。补血脉,解邪热镇静安神,解毒”^[9]。《本草害利》认为“猪心血用作补心药之向导,盖取以心归心,以血导血之意”^[10]。生酸枣仁炒后质脆易碎,便于有效成分的煎出,而猪心血炒酸枣仁则可增强宁心安神作用^[5],用于治疗不眠症。

现阶段已有文献对酸枣仁炮制工艺进行了优选。炒酸枣仁炮制工艺采用正交试验,以斯皮诺素含量为指标,发现实验过程中炮制温度与时间对斯皮诺素含量的影响很大^[11]。隋利强等^[12]采用正交试验优选蜜酸枣仁的炮制工艺,以饮片外观、水溶性浸出物、脂肪油、总黄酮、斯皮诺素、酸枣仁皂苷 A 含量为指标,通过方差分析表明炮制温度对结果的影响具有统计学意义。酸枣仁中黄酮类成分斯皮诺素、皂苷类成分酸枣仁皂苷 A 是酸枣仁镇静催眠活性的主要成分^[13],为 2015 年版《中国药典》中酸枣仁质量标准所规定的质控成分。目前,尚未发现猪心血炒酸枣仁炮制工艺优选的相关报道,对猪心血炒酸枣仁的炮制依然缺乏重要的工艺参数等内容,如炒制时间、炒制温度、猪心血用量等并均无明确的数值,严重影响了这一特色炮制品的开发与应用。在单因素试验及预试验基础上,本实验选用斯皮诺素、酸枣仁皂苷 A 为指标性成分,采用星点设计-效应面法优选猪心血炒酸枣仁的炮制工艺,为地方特色炮制工艺的传承和发展奠定基础。

1 材料

YF-111B 型高速中药粉碎机(瑞安市永历制药机械有限公司),e2695 型高效液相色谱系统(美国 Waters 公司,配备 Empower 色谱工作站,2998 型紫外检测器,2424 型蒸发光散射检测器),AE240 型 1/10 万电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司),SQP 型 1/1 万电子天平(德国赛多利斯公司),ST20 型红外

测温仪(美国雷泰公司)。

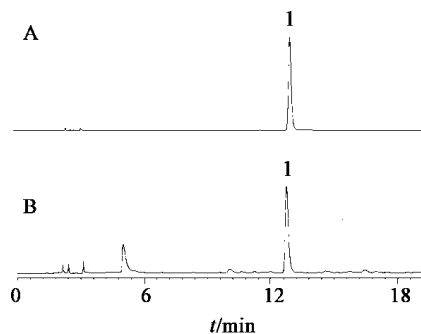
酸枣仁(樟树市东北参茸药站,批号 20161120,产地河北,经江西中医药大学龚千锋教授鉴定为鼠李科植物酸枣 *Ziziphus jujuba* var. *spinosa* 的干燥成熟种子),猪心血(江西省南昌市天亮食品有限公司,生猪定点屠宰场现场提供),石油醚(西陇化工股份有限公司),斯皮诺素、酸枣仁皂苷 A 对照品(成都曼思特生物科技有限公司,批号分别为 MUST-16060204, MUST-16022403,纯度分别为 99.35%,98.60%),水为娃哈哈纯净水,乙腈、甲醇均为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 猪心血炒酸枣仁的制备^[4] 将新鲜猪心剖开,挤出的猪心血滴入盛有适量清水的容器内,搅匀,再与酸枣仁拌匀,待吸尽后,置铜锅内,用文火炒干即可。

2.2 斯皮诺素的含量测定

2.2.1 色谱条件 Agilent Eclipse XDB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相水(A)-乙腈(B)梯度洗脱(0 ~ 10 min, 12% ~ 19% B; 10 ~ 16 min, 19% ~ 20% B; 16 ~ 19 min, 20% ~ 60% B),柱温 30 °C,流速 1 mL · min⁻¹,检测波长 335 nm,进样量 10 μL。见图 1。



A. 对照品; B. 供试品; 1. 斯皮诺素

图 1 猪心血炒酸枣仁中斯皮诺素的 HPLC

Fig. 1 HPLC chromatograms of spinosin in *Ziziphi Spinosae* Semen processed with pig's heart blood

2.2.2 对照品溶液的制备 精密称取斯皮诺素对照品适量,加甲醇稀释成质量浓度 0.21 g · L⁻¹的对照品溶液,过 0.22 μm 微孔滤膜,备用。

2.2.3 供试品溶液的制备^[14] 取不同条件下炮制的猪心血炒酸枣仁粉末(过四号筛,下同)约 1 g,精密称定,置索氏提取器中,加入石油醚(60 ~ 90 °C) 95 mL,加热回流 4 h,弃去石油醚液,药渣挥去溶剂,转移至锥形瓶中,加入 70% 乙醇 20 mL,加热回流 2 h,滤过,滤渣用 70% 乙醇 5 mL 洗涤,合并洗液

与滤液,回收溶剂至干,残渣加甲醇使溶解并转移至 5 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,经 0.22 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.2.4 标准曲线制备 分别精密吸取斯皮诺素对照品溶液 4, 6, 8, 10, 12, 14 μL, 按 2.2.1 项下色谱条件测定,以进样量为横坐标,峰面积积分为纵坐标,得回归方程 $Y = 2 \times 10^6 X - 284\ 384$ ($R^2 = 0.999\ 9$),线性范围 0.84 ~ 2.94 μg。

2.2.5 精密度试验 精密吸取 2.2.2 项下对照品溶液 10 μL,按 2.2.1 项下色谱条件连续测定 6 次,结果斯皮诺素峰面积的 RSD 0.6%,表明仪器精密度良好。

2.2.6 重复性试验 精密称取同一猪心血炒酸枣仁样品 6 份,按 2.2.3 项下方法制备供试品溶液,按 2.2.1 项下色谱条件测定,结果斯皮诺素平均质量分数 0.125 9%,RSD 1.2%。

2.2.7 稳定性试验 取同一猪心血炒酸枣仁的供试品溶液,分别于制备后 0, 2, 4, 6, 8, 12, 24 h 按 2.2.1 项下色谱条件测定,结果斯皮诺素峰面积的 RSD 1.3%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.2.8 加样回收率试验 精密称定已知斯皮诺素含量的(斯皮诺素质量分数 1.285 9 mg·g⁻¹)同一猪心血炒酸枣仁粉末 6 份,每份约 0.5 g,精密添加一定量的斯皮诺素对照品,按 2.2.3 项下方法制备供试品溶液,按 2.2.1 项下色谱条件测定,结果平均回收率 98.94%,RSD 1.3%,见表 1。

表 1 斯皮诺素含量测定的加样回收试验

Table 1 Recovery test of spinosin

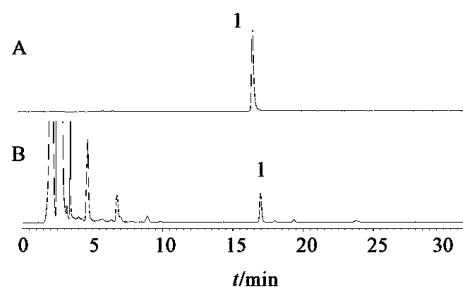
称样量 /g	样品中量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
0.501 3	0.644 6	1.254 6	96.83		
0.501 1	0.644 4	1.264 4	98.41		
0.500 6	0.643 7	1.277 7	100.63	98.94	1.3
0.502 3	0.645 9	1.270 9	99.21		
0.501 2	0.644 5	1.266 5	98.73		
0.500 4	0.643 5	1.272 5	99.84		

注:加入量均为 0.63 mg。

2.3 酸枣仁皂苷 A 的含量测定

2.3.1 色谱条件 采用 Hypersil ODS2 C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相水(A)-乙腈(B)梯度洗脱(0 ~ 15 min, 20% ~ 40% B; 15 ~ 28 min, 40% B; 28 ~ 30 min, 40% ~ 70% B; 30 ~ 32 min, 70% ~ 100% B),柱温 30 °C,流速 1 mL·min⁻¹,蒸发

光散射检测器(ELSD),漂移管温度 65 °C,增益 150,气压 0.310 MPa,喷雾器动力级别 60%,喷口温度 36 °C,进样量 10 μL。见图 2。



A. 对照品; B. 供试品; 1. 酸枣仁皂苷 A

图 2 猪心血炒酸枣仁中酸枣仁皂苷 A 的 HPLC

Fig. 2 HPLC chromatograms of jujuboside A in Ziziphi Spinosae Semen processed with pig's heart blood

2.3.2 对照品溶液的配制 精密称取酸枣仁皂苷 A 对照品适量,加甲醇溶解成 0.118 g·L⁻¹ 溶液,过 0.22 μm 微孔滤膜,即得。

2.3.3 供试品溶液的制备 同 2.2.3 项。

2.3.4 标准曲线制备 分别精密吸取酸枣仁皂苷 A 对照品溶液 5, 10, 15, 20, 25 μL, 按 2.3.1 项下色谱条件测定,以进样量的常用对数为横坐标,峰面积积分值的常用对数为纵坐标,得回归方程 $Y = 1.844\ 8X + 5.061\ 9$ ($R^2 = 0.999\ 2$),线性范围 0.59 ~ 2.95 μg。

2.4 猪心血炒酸枣仁炮制工艺的优选

2.4.1 星点设计 根据单因素试验及预试验结果,选择炒制时间、炒制温度、猪心血用量为自变量,每个自变量设计 5 个水平,以斯皮诺素和酸枣仁皂苷 A 质量分数的总评“归一值”(overall desirability, OD)为因变量。精密称取酸枣仁样品 40 g,共 20 份,按星点设计的炮制工艺参数进行试验,试验安排及结果见表 2。OD = (d₁d₂...d_k)^{1/k} (k 为指标数),2 个指标的数值均为越大越好,故采用 Hassan 方法进行数学转换求算 OD^[15], $d_{\max} = (Y_i - Y_{\min}) / (Y_{\max} - Y_{\min})$ 。

2.4.2 模型拟合与响应面分析 采用 Design Expert 8.0.6.1 软件进行数据处理,得拟合方程为 $OD = -1.810 - 0.091A + 0.027B + 0.163C + 9.369 \times 10^{-4} AB + 0.012AC - 1.605 \times 10^{-3} BC - 0.013A^2 - 6.228 \times 10^{-5} B^2 + 2.124 \times 10^{-3} C^2$ ($r = 0.915\ 8$),说明该方程拟合度较好,且差异性极显著,方差分析见表 3。绘制各自变量与 OD 的响应曲面,见图 3。预测最优工艺参数为炒制温度 131 °C,炒制时间 6.1 min,猪心血用量 10%,在此条件炮制下 OD 预测值 0.830。

表 2 猪心血炒酸枣仁炮制工艺优选的星点试验分析

Table 2 Central composite test analysis for processing technology of Ziziphi Spinosae Semen stir-fried with pig's heart blood

No.	A 炒制时间 /min	B 炒制温度 /°C	C 猪心 血用量 /%	斯皮诺素 /%	酸枣仁 皂苷 A /%	OD
1	6.50	150.00	3.17	0.128 6	0.083 5	0.697
2	3.00	180.00	5.00	0.125 5	0.080 9	0.586
3	10.00	120.00	5.00	0.112 7	0.078 7	0
4	10.00	120.00	10.00	0.124 0	0.090 9	0.685
5	6.50	98.04	7.50	0.119 4	0.079 4	0.406
6	3.00	180.00	10.00	0.115 6	0.093 2	0.360
7	3.00	120.00	10.00	0.123 6	0.095 4	0.723
8	0.44	150.00	7.50	0.120 5	0.087 3	0.532
9	6.50	150.00	11.83	0.126 1	0.098 6	0.843
10	6.50	201.96	7.50	0.131 7	0.081 2	0.718
11	10.00	180.00	10.00	0.128 2	0.086 0	0.728
12	3.00	120.00	5.00	0.117 6	0.091 6	0.455
13	10.00	180.00	5.00	0.127 8	0.074 5	0.512
14	12.56	150.00	7.50	0.123 3	0.062 7	0
15~20	6.50	150.00	7.50	0.125 9	0.089 1	0.715

注:15~20 号为重复性试验。

表 3 回归方程的方差分析

Table 3 Variance analysis of regression equation

方差来源	SS	f	F	P
模型	0.950	9	12.09	0.000 3
A	0.090	1	10.26	0.009 4
B	0.053	1	6.09	0.033 2
C	0.100	1	11.69	0.006 6
AB	0.077	1	8.86	0.013 9
AC	0.092	1	10.55	0.008 7
BC	0.120	1	13.26	0.004 5
A ²	0.380	1	43.13	<0.000 1
B ²	0.049	1	5.66	0.038 6
C ²	0.003	1	0.32	0.585 4
残差	0.087	10		
失拟项	0.087	5		
纯误差	0	5		
总离差	1.040	19		

2.4.3 验证试验 称取同一批酸枣仁样品 3 份,每份 40 g,按优选的工艺条件制备猪心血炒酸枣仁,结果 OD 分别为 0.817,0.864,0.844,平均值 0.842,OD 预测值与真实值偏差 1.4%,表明该工艺预测性良好。

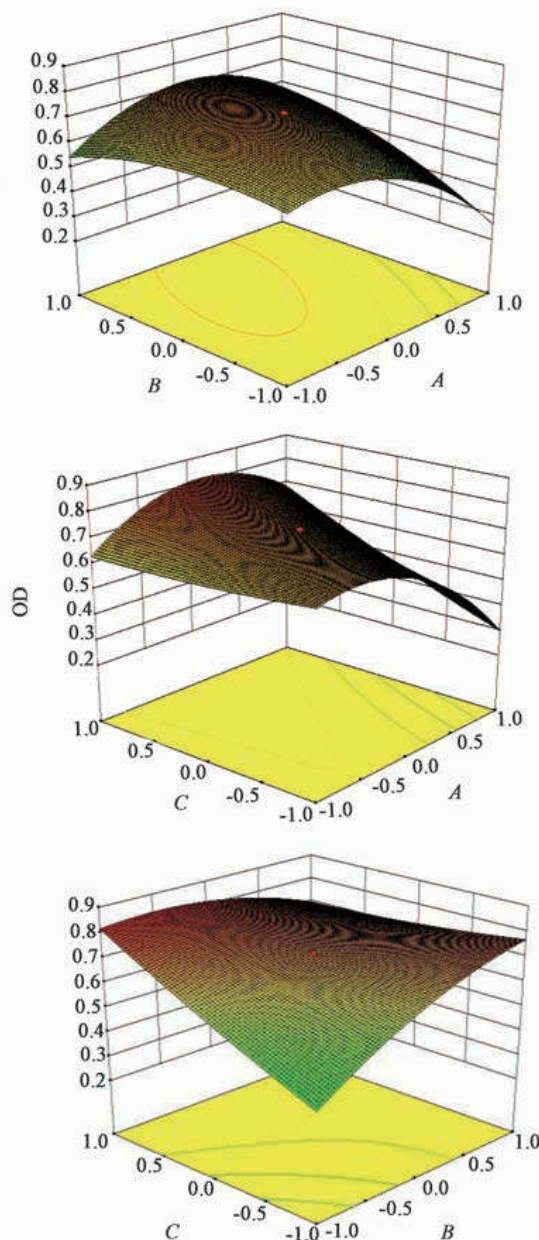


图 3 炒制时间、炒制温度、猪心血用量对猪心血炒酸枣仁炮制工艺影响的响应面

Fig. 3 Response surfaces of effect of stir-frying time, stir-frying temperature and pig's heart blood amount on processing technology of Ziziphi Spinosae Semen stir-fried with pig's heart blood

3 讨论

酸枣仁主要成分为皂苷类、黄酮类、生物碱类、脂肪酸类等,具有镇静催眠、抗焦虑、抗抑郁、抗炎、抗惊厥、保护心肌细胞、抗心律失常、改善血液流变学、抑制动脉粥样硬化和降低血压等作用^[16-17]。酸枣仁中黄酮类成分斯皮诺素、皂苷类成分酸枣仁皂苷 A 是该药材镇静催眠活性的主要成分。酸枣仁皂苷 A 及其代谢产物透过血脑屏障后既可以增加 γ -氨基丁酸 A 型(GABA_A)受体的表达,也对钙调蛋白对 Ca²⁺ 的转换产生影响,与大脑中的兴奋性神经递质谷氨酸产生拮抗作用,进而对动物的脑电波和睡眠行为产生作用^[13]。WANG 等^[18]报道斯皮诺素

可显著增强戊巴比妥诱导的睡眠,缩短睡眠潜伏期。故本文选用斯皮诺素及酸枣仁皂苷 A 为指标性成分。此外相关酸枣仁镇静催眠成分的研究表明,酸枣仁油中的不饱和脂肪酸部分能明显抑制小鼠的自主活动次数,缩短戊巴比妥钠引起的睡眠潜伏期,延长睡眠时间^[19],酸枣仁总生物碱可使小鼠自主活动减少,与戊巴比妥钠具有协同作用,并能对抗土的宁引起的小鼠惊厥作用^[20]。可见,酸枣仁镇静催眠的作用还与酸枣仁的脂肪酸和总生物碱等密切相关。后续进行猪心血炒酸枣仁炮制机制研究时,建议选择更多的成分作为考察指标。

本实验采用星点设计-效应面法优选猪心血炒酸枣仁的炮制工艺,优选的炮制工艺参数准确,炮制工艺稳定可行且预测性良好。猪心血炒酸枣仁与其他炮制方法样品的差别还需从化学成分、药理、药效等方面来进行对比研究,为后续研究猪心血炒酸枣仁的药效与炮制机制提供参考,为地方特色炮制工艺的传承和发展奠定基础。

[参考文献]

[1] 钟赣生. 中药学[M]. 北京:中国中医药出版社,2012:335-336.
[2] 福建省卫生厅. 福建省中药炮制规范[M]. 福州:福建科学技术出版社,1988:498-499.
[3] 北京市药品监督管理局. 北京市中药饮片炮制规范[M]. 北京:化学工业出版社,2010:286.
[4] 江西省食品药品监督管理局. 江西省中药饮片炮制规范[M]. 上海:上海科学技术出版社,2009:360-361.
[5] 龚千锋,黄文鸿,朱国强,等. 樟树中药炮制全书[M]. 南昌:江西科学技术出版社,1990:282-283.
[6] 陈源泉. 浅谈“酸枣仁”的炮制与功效关系[J]. 中国基层医学,1995,2(S1):51-52.
[7] 明·倪朱谟. 本草汇言[M]. 戴慎,陈仁寿,虞舜,点校. 上海:上海科学技术出版社,2005:1062.

[8] 清·汪切庵. 本草易读[M]. 吕广振,陶振岗,王海亭,唐永忠,点校. 北京:人民卫生出版社,1987:344.
[9] 王桢. 食物疗法精萃[M]. 太原:山西人民出版社,1985:199.
[10] 清·凌奂. 本草害利[M]. 北京:中医古籍出版社,1982:6.
[11] 耿欣,李廷利. 正交设计法优化炒酸枣仁的炮制工艺[J]. 中医药学报,2016,44(4):60-62.
[12] 隋利强,王建,陈喆明,等. 蜜炙酸枣仁炮制工艺初步研究[J]. 湖南中医药大学学报,2016,36(7):48-50.
[13] 马进杰,刘萍,马百平. 酸枣仁化学成分及其镇静催眠作用研究进展[J]. 国际药学研究杂志,2011,38(3):206-211.
[14] 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,2015:366-367.
[15] Abu-Lizza K A, Carci-Contreras L, LU D R. Preparation and evaluation of sustained release AZT-loaded microspheres: optimization of the release characteristics using response surface methodology [J]. J Pharm Sci, 1996,85(2):144-149.
[16] 耿欣,李廷利. 酸枣仁主要化学成分及药理作用研究进展[J]. 中医药学报,2016,44(5):84-86.
[17] 张舜波,王平,田代志,等. 酸枣仁总皂苷对失眠老年大鼠脑氨基酸类神经递质及受体表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(4):124-127.
[18] WANG L E, BAI Y J, SHI X R, et al. Spinosin, a C-glycoside flavonoid from Semen Ziziphi Spinozae, potentiated pentobarbital-induced sleep via the serotonergic system [J]. Pharmacol Biochem Behav, 2008,90(3):399-403.
[19] 赵启铎. 酸枣仁油中不饱和脂肪酸的药理实验研究[J]. 天津中医药,2005,22(4):331-333.
[20] 符敬伟,乔卫,陈朝晖. 酸枣仁总生物碱镇静催眠作用的实验研究[J]. 天津医科大学学报,2005,11(1):52-54.

[责任编辑 刘德文]