

酸枣仁饮片汤剂质量评价研究

张敏^{1,4}, 杜晨晖^{2*}, 马敏³, 张福生¹, 高晓霞¹, 闫艳^{1*}, 秦雪梅¹

1. 山西大学 中医药现代研究中心, 山西 太原 030006

2. 山西中医药大学, 山西 太原 030619

3. 山西省食品药品检验所, 山西 太原 030001

4. 山西大学化工学院, 山西 太原 030006

摘要: **目的** 建立酸枣仁饮片汤剂质量评价方法。**方法** 收集 10 批酸枣仁饮片, 制备成饮片汤剂。以出膏率和指标成分含量为指标, 优化提取工艺。采用 HPLC-UV/ELSD 技术, 建立多维度酸枣仁饮片汤剂指纹图谱。以相似度及相对保留时间、相对峰面积 RSD 综合评价 10 批酸枣仁饮片汤剂的质量。建立 LC-MS/MS 同时测定乌药碱、木兰花碱、维采宁、斯皮诺素、当药黄素、山柰酚-3-O-芸香糖苷、6''-阿魏酰斯皮诺素、酸枣仁皂苷 A 和 B 9 种指标成分含量的方法, 并应用于酸枣仁饮片汤剂的质量评价。**结果** 10 批酸枣仁饮片汤剂的平均出膏率为 20.77%。在 HPLC-UV 227、335 nm 和 HPLC-ELSD 指纹图谱中分别标定了 3、4、2 个共有峰, 不同检测波长下指纹图谱的相似度为 0.942~0.988; 相对保留时间和相对峰面积 RSD 均小于 3%。9 种指标成分在相应的浓度范围内线性关系良好, 相关系数 r 均 >0.999 0; 平均加样回收率为 87.40%~110.42%, RSD 均 $<4.12\%$ 。10 批酸枣仁饮片汤剂中 9 种指标性成分的质量分数分别为乌药碱 0.25~0.27 mg/g、木兰花碱 3.2~3.6 mg/g、维采宁 0.077~0.084 mg/g、斯皮诺素 0.82~0.89 mg/g、当药黄素 0.007 6~0.008 5 mg/g、山柰酚-3-O-芸香糖苷 0.057~0.060 mg/g、6''-阿魏酰斯皮诺素 0.32~0.35 mg/g、酸枣仁皂苷 A 0.83~0.91 mg/g、酸枣仁皂苷 B 0.095~0.110 mg/g。**结论** 建立了稳定、可靠的酸枣仁饮片汤剂质量评价方法, 为后续药动学和药效学实验提供稳定的物质基础, 同时为含酸枣仁的成方制剂质量控制提供依据。

关键词: 酸枣仁; 饮片汤剂; HPLC; 指纹图谱; 质量评价; 乌药碱; 木兰花碱; 维采宁; 斯皮诺素; 当药黄素; 山柰酚-3-O-芸香糖苷; 6''-阿魏酰斯皮诺素; 酸枣仁皂苷 A; 酸枣仁皂苷 B

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)19-4520-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.19.009

Quality evaluation system for slice decoction of *Ziziphi Spinosae Semen*

ZHANG Min^{1,4}, DU Chen-hui², MA Min³, ZHANG Fu-sheng¹, GAO Xiao-xia¹, YAN Yan¹, QIN Xue-mei¹

1. Modern Research Center for Traditional Chinese Medicine, Shanxi University, Taiyuan 030006, China

2. Shanxi University of Traditional Chinese Medicine, Taiyuan 030619, China

3. Shanxi Provincial Institute for Food and Drug Control, Taiyuan 030001, China

4. College of Chemistry and Chemical Engineering, Shanxi University, Taiyuan 030006, China

Abstract: Objective To establish a quality evaluation system for slice decoction of *Ziziphi Spinosae Semen* (SZR). **Methods** Ten batches of SZR slice were collected and prepared into decoction, and then the decoctions of SZR were prepared as freeze-dried powders. The extraction rate and the content of the index components were used as indicators to optimize the extraction process. Multi-dimensional chemical fingerprints were established by HPLC coupled with UV detector and ELSD detector. The similarity, RSD of relative retention time, and RSD of relative peak area were analyzed to comprehensively evaluate the quality of ten batches of SZR slice decoction. A sensitive method based on ultra-HPLC coupled with triple quadrupole mass spectrometry (UPLC-MS/MS) was

收稿日期: 2018-05-18

基金项目: 国家自然科学基金青年基金资助项目 (81603289, 81603251); 山西省研究生联合培养基地人才培养项目 (2017JD01); 山西省科技攻关计划-振东专项 (2016ZD0105); 山西省基础研究计划项目自然科学基金项目 (2015011105); 地产中药功效物质研究与利用山西省重点实验室 (201605D111004); 山西大学引进人才事业发展经费 (226545022, 226545012, 226545006)

作者简介: 张敏 (1993—), 女, 在读硕士, 研究方向为中药质量控制。Tel: 15635147965 E-mail: 2862613255@qq.com

***通信作者** 闫艳 (1982—), 女, 硕士生导师, 研究方向为中药药效物质基础及中药质量评价。

Tel: (0351)7018379 E-mail: yanyan520@sxu.edu.cn

杜晨晖 (1981—), 男, 硕士生导师, 研究方向为中药药效物质基础。Tel: (0351)3179935 E-mail: duchenxi_2001@163.com

established and validated for quantitative analysis of the nine compounds in SZR slice decoction, including coclaurine, magnoflorine, vicenin II, spinosin, swertisin, kaempferol-3-*O*-rutoside, 6'''-feruloylspinosin, jujuboside A, and jujuboside B. Consequently, the developed methods were successfully applied to the quality assessment of SZR slice decoction. **Results** The average dry extraction rate of ten batches of SZR slice decoction was 20.77%. Three, four, and two common peaks were identified in the HPLC-UV 227 nm, 335 nm, and HPLC-ELSD fingerprints. The similarity of the fingerprints at different detection wavelengths was in the range of 0.942—0.988, relative retention time and relative peak area RSD% were less than 3%. The method validation results indicated that the methods were simple, specific and reliable. All the compounds showed good linearity ($r > 0.999 0$) with a relatively wide concentration range, acceptable recovery at 87.40%—110.42%, and RSD% less than 4.12%. The content of nine chemical compounds in ten batches of SZR slice decoction were as follows: 0.25—0.27 mg/g of coclaurine, 3.2—3.6 mg/g of magnoflorine, 0.077—0.084 mg/g of vicenin II, 0.82—0.89 mg/g of spinosin, 0.007 6—0.008 5 mg/g of swertisin, 0.057—0.060 mg/g of kaempferol-3-*O*-rutoside, 0.32—0.35 mg/g of 6'''-feruloylspinosin, 0.83—0.91 mg/g of jujuboside A, and 0.095—0.110 mg/g of jujuboside B. **Conclusion** A stable and reliable quality evaluation method of SZR slice decoction was established, which provides a stable material basis for the follow-up pharmacokinetic and pharmacodynamic experiments and provides a reference for the quality control of the prescription containing SZR at the same time.

Key words: *Ziziphi Spinosae Semen*; slice decoction; HPLC; fingerprint; quality evaluation; coclaurine; magnoflorine; vicenin II; spinosin; swertisin; kaempferol-3-*O*-rutoside; 6'''-feruloylspinosin; jujuboside A; jujuboside B

中药汤剂系指将药材饮片或粗颗粒加水煎煮或沸水浸泡后,去渣取汁而得到的液体制剂。中药汤剂是我国应用最早、中医临床广泛使用的一种剂型,其组方灵活、制法简便、疗效显著。中药汤剂还是中药配方颗粒、口服液、片剂等其他剂型的基本原料。由于中药饮片质量参差不齐、煎煮工艺各异,且缺乏切实可行的质量评价与监督体系,导致中药汤剂的质量悬殊,严重影响其临床疗效^[1-2]。

酸枣仁,始载于《神农本草经》,具有养心补肝、宁心安神、敛汗、生津之功效^[3]。现代药理研究表明酸枣仁具有镇静催眠、抗焦虑、抗抑郁、抗炎和抗惊厥等多种作用^[4]。酸枣仁中皂苷类、黄酮类和生物碱类成分是其发挥镇静催眠作用的主要药效物质基础^[5-6]。作为卫生部颁布的第 1 批药食同源物质^[7],酸枣仁多被制成酸枣仁糕、酸枣仁饮料、酸枣仁茶和酸枣仁粉等功能食品。作为临床上治疗失眠的首选药物,酸枣仁在治疗失眠的中药制剂中使用频率高达 58.8%^[8]。酸枣仁应用范围涉及从单味用药及组方配伍治疗失眠,到中成药原料等领域。《中国药典》2015 年版涉及含酸枣仁饮片且提取工艺为水提的成方制剂共 12 首,包括天王补心丸(浓缩丸)、归脾合剂、枣仁安神颗粒、柏子养心片、健脑安神片和解郁安神颗粒等。然而,有关酸枣仁饮片汤剂质量评价研究鲜见报道。

中药饮片汤剂的本质在于中药的整体性。近年来,“中药整体质量控制”模式已成为业界的共识,且得到了广泛应用^[9]。将该模式应用到中药饮片汤剂质量控制中,采用指纹图谱和多成分含量测定相

结合的整体质控模式,可以实现对中药饮片汤剂从宏观全息成分到微观指标成分的全面质量分析。本研究以出膏率和指标成分含量为依据,优化酸枣仁饮片汤剂提取工艺参数;建立 10 批酸枣仁饮片汤剂 HPLC-UV/ELSD 指纹图谱;采用 LC-MS/MS 法同时测定酸枣仁饮片汤剂中指标性成分,并标定各成分的含量范围。通过全息成分定性和指标成分定量相结合对酸枣仁饮片汤剂进行全面的全面质量评价。此研究不仅可保证不同批次酸枣仁饮片汤剂样品的均一性和一致性,也可为后续药动学和药效学实验提供稳定可控的物质基础,同时为含酸枣仁成方制剂的质量评价提供依据。

1 仪器与材料

岛津 LC-30AD 及 MS-8050 高效液相色谱-质谱联用仪,配在线真空脱气机、二元泵、恒温自动进样器、柱温箱、电喷雾离子化接口的三重四极杆质谱检测器以及 LC-MS Labsolution 色谱工作站,日本岛津有限公司; Waters e2695 高效液相色谱仪,配自动进样器、四元梯度泵、柱温箱、UV 检测器以及 Empower 色谱工作站,美国 Waters 公司; ELSD 6000 蒸发光散射检测器,天津市津分分析仪器制造有限公司; CPA225D 型十万分之一分析天平,德国 Sartorius 北京仪器系统有限公司; LGJ-10C 型冷冻干燥机,北京四环科学仪器厂有限公司。

对照品乌药碱(批号 HC225036198)、木兰花碱(批号 20160710)、维采宁(批号 HV187847198)、斯皮诺素(批号 20160314)、山柰酚-3-*O*-芸香糖苷(批号 20170417)、酸枣仁皂苷 A(批号 20160315)、

6"-阿魏酰斯皮诺素(批号 20160303)均购于宝鸡市辰光生物科技有限公司,对照品当药黄素(批号 140516)购于四川省维克奇生物科技有限公司,对照品酸枣仁皂苷 B(批号 20170210)购于南京春秋生物工程有限公司,经 HPLC 归一化法测定对照品的质量分数均大于 98%。甲醇、乙腈、甲酸为色谱纯,均购于 Fisher 公司。其他试剂均为分析纯。

10 批酸枣仁饮片购自不同饮片生产企业,具体为山西振东道地药材有限公司 4 批(批号 20161013、20161108、20161109、20161205,编号 S1~S4)、山西国新晋药集团古县兴岳连翘发展有限公司 3 批(批号 20170608、20170715、20170823,编号 S5~S7)、北京同仁堂山西太原燕莎店 1 批(批号 20170903,编号 S8)、北京同仁堂山西太原小店区店 1 批(批号 20171004,编号 S9)、山西太谷县药房 1 批(批号 20170907,编号 S10)。经山西中医药大学中药鉴定教研室杜晨晖副教授鉴定为鼠李科植物酸枣 *Ziziphus jujuba* Mill. var. *spinosa* (Bunge) Hu ex H. F. Chou 的干燥成熟种子。按照《中国药典》2015 年版方法对 10 批酸枣仁饮片进行水分和含量测定,均符合标准。

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 混合对照品溶液的制备 取对照品适量,精密称定,加初始流动相制备成含乌药碱 2.024 mg/mL、木兰花碱 2.016 mg/mL 的单一对照品溶液,加甲醇制备成含维采宁 2.000 mg/mL、斯皮诺素 2.052 mg/mL、当药黄素 2.018 mg/mL、山柰酚-3-O-芸香糖苷 2.038 mg/mL、6"-阿魏酰斯皮诺素 1.994 mg/mL、酸枣仁皂苷 A 2.056 mg/mL、酸枣仁皂苷 B 2.024 mg/mL 的单一对照品溶液。分别精密量取上述对照品储备液适量加甲醇制成混合对照品溶液。

2.1.2 酸枣仁饮片汤剂冻干粉的制备 取酸枣仁样品约 100 g,粉碎(60%过 1 号药典筛),精密称定,加 10 倍量水,浸泡 30 min,加热至沸,回流提取 2 h,滤过,滤渣再加 8 倍量水,加热回流提取 2 h,滤过,合并滤液;减压浓缩至 0.5 g/mL(生药量计),冷冻干燥,即得酸枣仁饮片汤剂冻干粉。10 批酸枣仁饮片均采用上述方法制成冻干粉待分析,编号分别为 S1~S10,得率依次为 20.83%、20.75%、20.33%、20.97%、21.96%、21.45%、21.90%、19.28%、20.06%、20.15%,RSD<4.10%。

2.1.3 供试品溶液的制备 取酸枣仁饮片汤剂的冻

干粉约 0.3 g,精密称定,置于 50 mL 具塞锥形瓶中,精密移取 70%甲醇 10 mL,称定质量,超声处理 20 min,放至室温,用 70%甲醇补足减失的质量,摇匀,13 000×g 离心 10 min(18 °C),上清液过 0.45 μm 微孔滤膜,续滤液作为供试品溶液。

2.2 HPLC-UV/ELSD 指纹图谱研究

2.2.1 色谱条件 色谱柱为 Apollo C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相为乙腈-0.1%甲酸水溶液,梯度洗脱条件:0~26 min,10%~20%乙腈;26~30 min,20%~23%乙腈;30~43 min,23%~26%乙腈;43~45 min,26%~37%乙腈;45~47 min,37%乙腈;47~54 min,37%~39%乙腈;54~63 min,39%~100%乙腈;体积流量为 1.0 mL/min;柱温 25 °C,进样量 10 μL;紫外检测波长为 227、335 nm;ELSD 参数:漂移管温度 105 °C,空气体积流量为 2.5 L/min。采用 227、335 nm 和 ELSD 检测器同时进行测定。对照品(A)和样品(B) HPLC-UV/ELSD 多维色谱图见图 1。

2.2.2 方法学考察

(1) 精密度试验:取同一批冻干粉样品(编号 S9),按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液,按“2.2.1”项下色谱条件连续进样 6 次,记录各共有峰的保留时间和峰面积。结果显示,HPLC-UV 227 nm、HPLC-UV 335 nm、HPLC-ELSD 指纹谱图中各共有

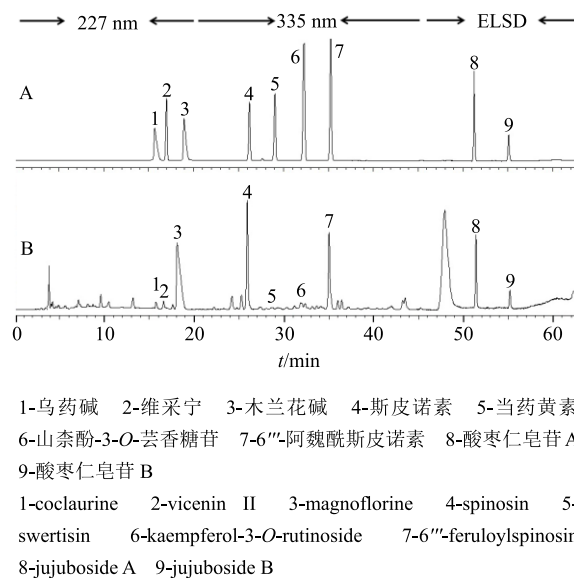


图 1 混合对照品(A)和酸枣仁饮片汤剂样品(B)的 HPLC-UV/ELSD 多维色谱图

Fig. 1 Multi-dimensional chromatogram of HPLC-UV/ELSD for mixed reference substances (A) and slice decoction of SZR samples (B)

峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均小于 3.0%，表明仪器精密度良好。

(2) 稳定性试验：取同一批冻干粉样品（编号 S9），按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液，分别于室温放置 0、3、6、9、12、24 h 后按“2.2.1”项下色谱条件进样分析，记录各共有峰的保留时间和峰面积。结果显示，HPLC-UV 227 nm、HPLC-UV 335 nm、HPLC-ELSD 指纹谱图中各共有峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均小于 3.0%，表明供试品溶液在室温条件下 24 h 内稳定性良好。

(3) 重复性试验：取同一批冻干粉样品（编号 S9），按“2.1.3”项下方法平行制备 6 份供试品溶液，按“2.2.1”项下色谱条件进样测定，记录各共有峰的保留时间和峰面积。结果显示，HPLC-UV 227 nm、HPLC-UV 335 nm、HPLC-ELSD 指纹谱图中各共有峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均小于 3.0%，表明该提取方法的重复性良好。

2.2.3 酸枣仁饮片汤剂指纹图谱的建立及相似度分析 取 10 批不同来源的酸枣仁饮片，按“2.1.2”项下方法制备酸枣仁饮片汤剂，按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液，按“2.2.1”项下色谱条件分析供试品溶液，记录 HPLC-UV/ELSD 图谱。采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统（2.0 版）”软件对上述图谱进行处理分析，以色谱图 S1 为指定参照图谱，采用中位数法，时间窗宽度为 0.1，对 10 批酸枣仁饮片汤剂的指纹图谱进行拟合生成对照图谱（R）；将峰面积较为稳定、分离度较好的色谱峰标定 3 个共有峰，其中以木兰花碱峰作为参比峰（S 峰）；HPLC-UV 335 nm 指纹图谱中标定 4 个共有峰，选择斯皮诺素峰作为参比峰（S 峰）；HPLC-ELSD 指纹图谱中标定 2 个共有峰，以酸枣仁皂苷 A 峰作为参比峰（S 峰），见图 2~4。10 批酸枣仁饮片汤剂的指纹图谱与对照指纹图谱自动匹配，227 nm 下相似度为 0.942~0.987，335 nm 下相似度为 0.951~0.988，ELSD 下相似度为 0.954~0.985；相对保留时间和相对峰面积 RSD 均小于 3%。

2.3 酸枣仁饮片汤剂中多指标成分含量测定

2.3.1 色谱及质谱条件

(1) 色谱条件：色谱柱为 Acquity UPLC® HSS T3 柱（150 mm×2.1 mm，1.8 μm），流动相为乙腈-0.1%甲酸水溶液，梯度洗脱程序：0~2 min，17%乙腈；2~4 min，17%~19%乙腈；4~10 min，19%~

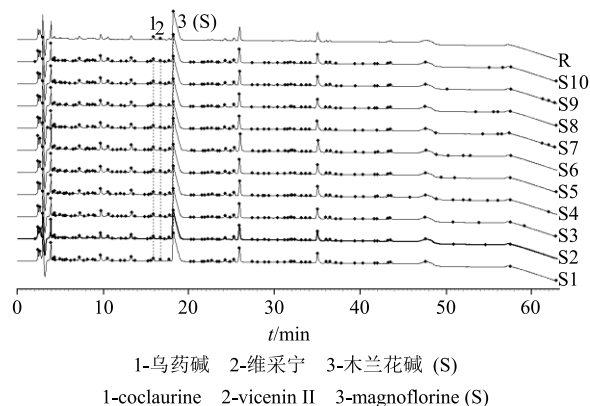


图 2 10 批酸枣仁饮片汤剂 HPLC-UV 227 nm 的指纹图谱和对照指纹图谱 (R)

Fig. 2 HPLC-UV 227 nm fingerprint and reference chromatogram (R) of 10 batches of SZR slice decoction

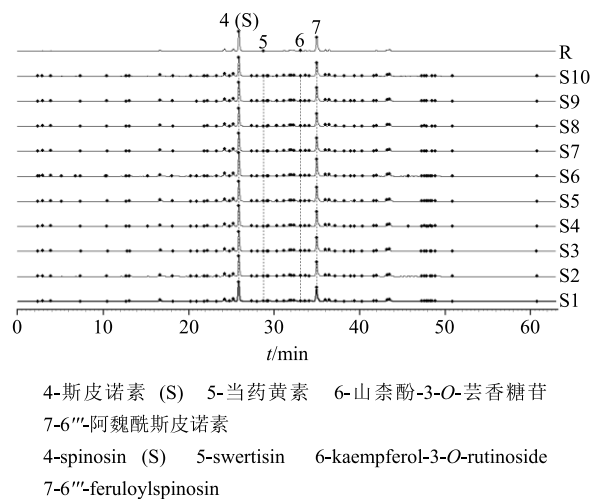


图 3 10 批酸枣仁饮片汤剂 HPLC-UV 335 nm 的指纹图谱和对照指纹图谱 (R)

Fig. 3 HPLC-UV 335 nm fingerprint and reference chromatogram (R) of 10 batches of SZR slice decoction

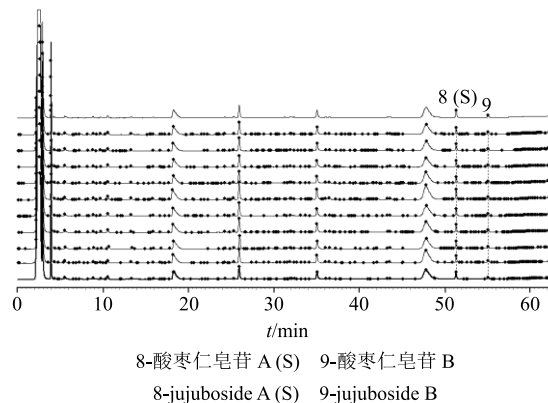


图 4 10 批酸枣仁饮片汤剂 HPLC-ELSD 的指纹图谱和对照指纹图谱 (R)

Fig. 4 HPLC-ELSD fingerprint and reference chromatogram (R) of 10 batches of SZR slice decoction

33%乙腈; 10~15 min, 33%~100%乙腈; 15~20 min, 100%~17%乙腈; 体积流量为 0.15 mL/min; 柱温为 40 °C; 进样量为 3 μL。

(2) 质谱条件: 离子源为 ESI 源; 正、负离子切换的扫描模式; 工作模式为多反应监测 (MRM);

雾化器体积流量 2.0 L/min; 干燥气体积流量 10.0 L/min; 加热气体积流量 10.0 L/min; 接口电压 4.0 kV; 接口温度 300 °C; DL 温度 250 °C; 加热块温度 400 °C; CID 气 270 kPa。9 种指标成分的质谱参数及 MRM 质谱图见表 1 和图 5。

表 1 酸枣仁饮片汤剂中 9 种指标成分的质谱参数

Table 1 Mass spectrum parameters of nine compounds in SZR slice decoction

指标成分	离子模式	MRM 离子对	预杆电压 Q1/V	碰撞能量 CE/eV	预杆电压 Q3/V
乌药碱	[M+H] ⁺	286.0→194.1	42	46	42
木兰花碱	[M] ⁺	342.1→222.3	35	30	35
维采宁	[M+H] ⁺	595.3→325.3	115	48	115
斯皮诺素	[M+H] ⁺	609.5→327.3	98	35	98
当药黄素	[M+H] ⁺	447.2→267.2	38	35	38
山柰酚-3-O-芸香糖苷	[M+H] ⁺	595.2→287.3	35	30	35
6'''-阿魏酰斯皮诺素	[M+H] ⁺	785.4→327.3	76	46	76
酸枣仁皂苷 A	[M-H] ⁻	1 205.3→1 073.8	32	46	30
酸枣仁皂苷 B	[M-H] ⁻	1 043.3→911.1	50	37	34

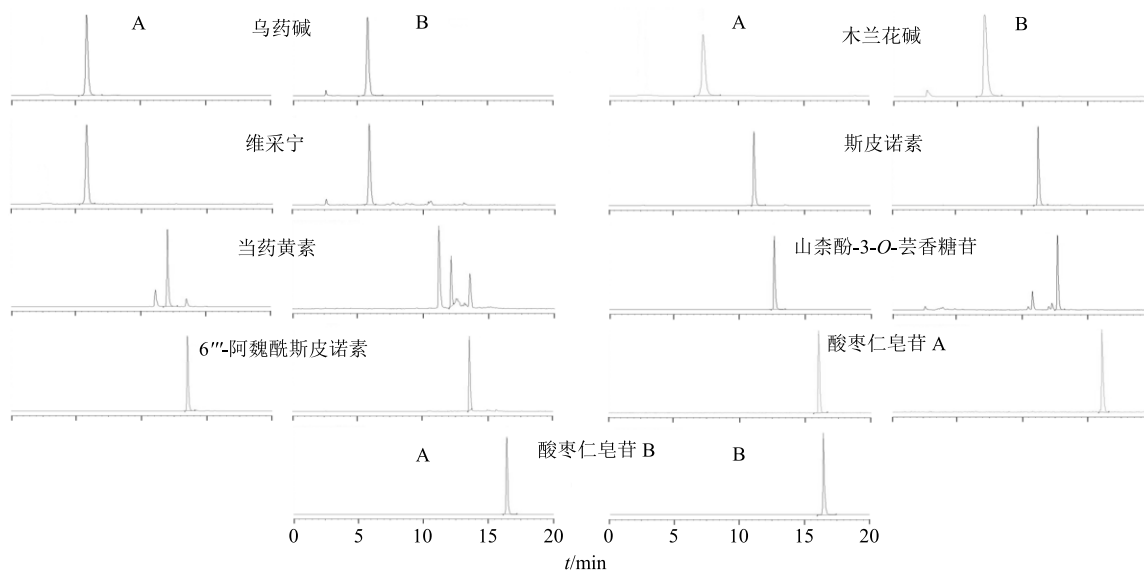


图 5 混合对照品 (A) 和酸枣仁饮片汤剂供试品溶液 (B) 中 9 种指标成分的 MRM 质谱图

Fig. 5 MRM mass spectra of nine chemical markers in mixed standard solutions (A) and SZR slice decoction (B)

2.3.2 方法学考察

(1) 线性关系考察: 精密量取混合对照品溶液适量, 加甲醇逐级稀释 1/2、1/4、1/8、1/16、1/32、1/64 倍, 摇匀, 制成 6 个质量浓度梯度的混合对照品溶液。按“2.3.1”项色谱质谱条件依次进样分析, 以指标成分的峰面积为纵坐标 (Y), 质量浓度为横坐标 (X), 进行线性回归, 得回归方程、相关系数 (r) 和线性范围; 按信噪比 S/N=3 计算 9 种指标成分的检测限 (LOD), 按信噪比 S/N=10 计算其定量限 (LOQ), 结果见表 2, 9 种指标成分在各自质量

浓度范围内线性关系均良好。

(2) 精密度试验: 精密吸取同一混合对照品溶液 3 μL, 按“2.3.1”项色谱质谱条件连续进样 6 次, 记录 9 种指标成分的峰面积, 并计算其峰面积的 RSD 值, 结果显示, 9 种指标成分乌药碱、木兰花碱、维采宁、斯皮诺素、当药黄素、山柰酚-3-O-芸香糖苷、6'''-阿魏酰斯皮诺素、酸枣仁皂苷 A、酸枣仁皂苷 B 的 RSD 分别为 1.46%、1.59%、2.24%、1.35%、2.92%、2.74%、2.33%、1.23%、1.75%, 表明仪器精密度良好。

表 2 9 种指标成分的回归方程、相关系数、线性范围、LOD 和 LOQ

Table 2 Liner regression, correlation coefficient, range, LOD, and LOQ of nine compounds

指标成分	回归方程	<i>r</i>	线性范围/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	LOD/($\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)	LOQ/($\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)
乌药碱	$Y=2.59\times 10^6 X+1.53\times 10^6$	0.999 9	0.61~15.18	0.90	1.10
木兰花碱	$Y=7.68\times 10^5 X+4.20\times 10^6$	0.999 7	5.04~60.48	1.00	3.40
维采宁	$Y=1.53\times 10^5 X+3.77\times 10^4$	0.999 6	0.09~9.00	5.00	15.00
斯皮诺素	$Y=1.51\times 10^5 X+1.18\times 10^5$	0.999 0	0.37~36.94	12.30	60.00
当药黄素	$Y=3.46\times 10^6 X+3.45\times 10^4$	0.999 5	0.03~2.02	1.40	5.00
山柰酚-3- <i>O</i> -芸香糖苷	$Y=1.51\times 10^6 X+5.63\times 10^4$	0.999 8	0.03~3.06	0.85	3.40
6''-阿魏酰斯皮诺素	$Y=2.88\times 10^5 X+4.4\times 10^4$	0.999 9	1.05~20.94	3.60	11.00
酸枣仁皂苷 A	$Y=1.23\times 10^4 X+822$	0.999 6	0.62~25.70	7.30	70.00
酸枣仁皂苷 B	$Y=3.52\times 10^6 X+6.23\times 10^5$	0.999 5	0.12~6.07	0.18	0.42

(3) 稳定性试验: 取同一批冻干粉样品(编号 S9), 按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液, 于室温放置 0、2、4、6、12、24 h 后按“2.3.1”项下色谱质谱条件进样, 以峰面积为指标进行分析, 计算 9 种指标成分峰面积的 RSD 值, 结果显示, 乌药碱、木兰花碱、维采宁、斯皮诺素、当药黄素、山柰酚-3-*O*-芸香糖苷、6''-阿魏酰斯皮诺素、酸枣仁皂苷 A、酸枣仁皂苷 B 的 RSD 分别为 2.98%、2.75%、2.56%、2.89%、2.83%、2.34%、2.33%、2.32%、2.11%, 表明供试品溶液在室温条件下 24 h 内稳定。

(4) 重复性试验: 取同一批冻干粉样品(编号 S9) 6 份, 每份约 27 mg, 精密称定, 按“2.1.3”项下方法平行制备供试品溶液 6 份, 按“2.3.1”项下色谱质谱条件进行分析, 分别记录 9 种指标成分乌药碱、木兰花碱、维采宁、斯皮诺素、当药黄素、山柰酚-3-*O*-芸香糖苷、6''-阿魏酰斯皮诺素、酸枣仁皂苷 A、酸枣仁皂苷 B 的峰面积, 计算其质量分数分别为 1.00、15.51、0.35、3.93、0.041、0.11、0.80、4.30、0.42 mg/g, 其 RSD 分别为 0.65%、0.67%、1.97%、0.85%、5.40%、1.37%、3.42%、2.26%、1.37%, 表明提取方法的精密度良好。

(5) 加样回收率试验: 取已测定含量的冻干粉样品 6 份, 每份约 13.5 mg, 精密称定, 置于具塞锥形瓶中, 分别精密加入与样品中各成分含量相当的混合对照品溶液, 按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液, 按“2.3.1”项下色谱、质谱条件进样分析, 记录指标成分的峰面积, 计算其平均加样回收率及相应的 RSD 值, 结果乌药碱、木兰花碱、维采宁、斯皮诺素、当药黄素、山柰酚-3-*O*-芸香糖苷、6''-阿魏酰斯皮诺素、酸枣仁皂苷 A、酸枣仁皂苷 B 的平均回收率分别为 110.42%、95.54%、93.35%、

100.09%、98.11%、87.40%、98.05%、96.07%、106.87%, RSD 分别为 0.58%、2.92%、2.98%、1.24%、2.68%、1.88%、2.67%、2.85%、2.60%, 表明提取方法的准确度良好。

2.3.3 样品测定 分别取待测的 10 批酸枣仁饮片汤剂的冻干粉, 每批约 0.3 mg, 精密称定, 按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液, 按“2.3.1”项下色谱质谱条件进样测定, 计算 9 种指标成分的含量(以生药量计), 结果见表 3 和图 6。

3 讨论

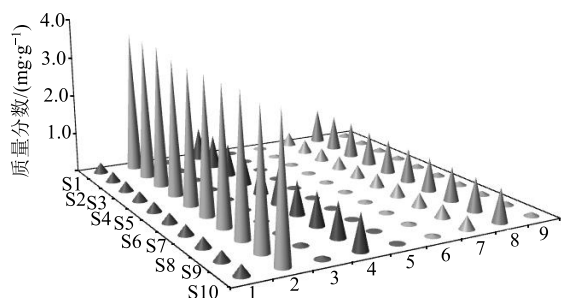
3.1 酸枣仁饮片汤剂制备工艺的考察

在中药提取过程中, 破碎方式和煎煮时间对其有效成分的溶出均有较大影响。中医用药有“逢壳必捣, 逢籽必破”之说。《雷公炮炙论》记载:“酸枣仁, 凡使, 采得后, (晒)干, 取叶重拌, 蒸半日了, 去皮尖了, 任研用”, 首次提出酸枣仁用时需研磨。《中国药典》2015 年版规定, 酸枣仁饮片用时捣碎。笔者对山西太原 21 家药店酸枣仁的破碎方式进行调查, 结果显示目前药店基本用机械粉碎替代了传统铜冲捣碎。为此, 本研究以出膏率、斯皮诺素、酸枣仁皂苷 A 和 B 的含量为指标, 对铜冲捣碎和机械粉碎及提取时间进行比较, 结果显示机械粉碎(出膏率 16.4%、斯皮诺素 0.090%、酸枣仁皂苷 A 0.089%、酸枣仁皂苷 B 0.057%)优于铜冲捣碎(出膏率 13.7%、斯皮诺素 0.054%、酸枣仁皂苷 A 0.050%、酸枣仁皂苷 B 0.031%)。机械粉碎方式方便快捷, 均一性好, 有利于有效成分溶出, 值得推广。按照传统中药汤剂提取的方法, 考察了提取时间(头煎和二煎分别 30、20 min; 60、40 min; 90、60 min; 120、120 min), 结果表明, 2 次煎煮时间均为 120 min 时, 出膏率(20.6%)及斯皮诺素

表 3 10 批酸枣仁饮片汤剂中 9 种指标成分测定结果

Table 3 Quantifiable of nine chemical markers in 10 samples for SZR slice decoction

批号	质量分数/(mg·g ⁻¹)								
	乌药碱	木兰花碱	维采宁	斯皮诺素	当药黄素	山柰酚-3-O-芸香糖苷	6''-阿魏酰斯皮诺素	酸枣仁皂苷 A	酸枣仁皂苷 B
S1	0.27	3.6	0.078	0.82	0.008 4	0.060	0.34	0.89	0.101
S2	0.26	3.5	0.080	0.83	0.007 9	0.060	0.35	0.89	0.095
S3	0.26	3.6	0.077	0.82	0.007 7	0.057	0.34	0.91	0.097
S4	0.25	3.4	0.078	0.83	0.007 9	0.058	0.34	0.86	0.096
S5	0.25	3.3	0.083	0.85	0.008 1	0.059	0.33	0.86	0.095
S6	0.25	3.4	0.084	0.87	0.008 1	0.056	0.35	0.85	0.098
S7	0.26	3.4	0.081	0.84	0.008 0	0.057	0.35	0.83	0.103
S8	0.26	3.4	0.079	0.84	0.008 0	0.059	0.35	0.85	0.101
S9	0.25	3.3	0.082	0.87	0.007 7	0.060	0.33	0.84	0.101
S10	0.26	3.4	0.084	0.89	0.008 0	0.059	0.33	0.83	0.100



1-乌药碱 2-木兰花碱 3-维采宁 4-斯皮诺素 5-当药黄素
6-山柰酚-3-O-芸香糖苷 7-6''-阿魏酰斯皮诺素 8-酸枣仁皂苷 A 9-酸枣仁皂苷 B
1-coclaurine 2-magnoflorine 3-vicenin II 4-spinosin
5-swertisin 6-kaempferol-3-O-rutinoside 7-6''-feruloylspinosin
8-jujuboside A 9-jujuboside B

图 6 10 批酸枣仁饮片汤剂中 9 种指标成分含量柱状图

Fig. 6 Quantifiable comparison of 3D graphs of HPLC chromatograph of nine chemical markers in 10 samples for SZR slice decoction

(0.115%)、酸枣仁皂苷 A (0.106%) 和 B (0.077%) 的含量最高。

中药汤剂含大量糖类、蛋白质和氨基酸，不宜久存，需临用新制；此外汤剂多呈悬浊液，取样均一性不好掌握^[10]。目前，真空冷冻干燥技术在中药研究中的应用越来越广泛，其采用低温脱水技术，避免中药中热敏性成分和易氧化成分变质，并且所得制品质地蓬松，复水性好，利于长期保存^[11]。本研究以斯皮诺素、酸枣仁皂苷 A 和 B 的含量为指标比较了酸枣仁饮片汤剂 2 种保存方式（汤剂和冻干粉），结果显示冻干粉（斯皮诺素 0.107%、酸枣仁皂苷 A 0.100%、酸枣仁皂苷 B 0.074%）与汤剂（斯

皮诺素 0.109%、酸枣仁皂苷 A 0.103%、酸枣仁皂苷 B 0.075%）的含量无显著差异。故本研究将酸枣仁饮片汤剂制备成冻干粉保存。

3.2 指纹图谱条件的考察

中药指纹图谱可最大限度地表征药效相关成分或特征成分，满足整体性、专属性和重现性的要求^[12-16]。将指纹图谱应用于中药饮片汤剂的整体质量控制，可以全面表征汤剂中的化学成分信息。本研究在建立酸枣仁饮片汤剂指纹图谱时，首先考察了乙腈-0.1%甲酸水溶液和乙腈-0.1%三氟乙酸水溶液流动相系统，结果表明，乙腈-0.1%甲酸水溶液为流动相时，指纹图谱色谱峰峰形和分离度均较好。其次，分别比较了 4 个品牌色谱柱（Apollo C₁₈、Agilent Zorbax SB-C₁₈、Phenomenex Luna C₁₈、Waters XBridge C₁₈）对色谱峰的影响，结果表明，Apollo C₁₈ 色谱柱对黄酮类成分的峰容量多，且色谱峰分离度良好。

此外，生物碱在 227 nm 响应高，且在 20 min 内被洗脱；黄酮类成分在 335 nm 响应高，在 20~45 min 被洗脱；酸枣仁皂苷无紫外吸收，在质量型检测器 ELSD 下有响应，在 45~63 min 被洗脱出来，故本实验建立了多维度测定 3 种不同类型化合物的指纹图谱分析方法，实现了酸枣仁饮片汤剂中全息成分的表征。

3.3 含量测定指标成分的选择

课题组前期通过血清化学与网络药理学结合的方法初步遴选出乌药碱、斯皮诺素、当药黄素、酸枣仁皂苷 A 和 B 是其改善睡眠作用的潜在效应物

质^[17-18]。同时,文献报道6"-阿魏酰斯皮诺素^[19-20]、维采宁^[21]、山柰酚-3-*O*-芸香糖苷^[22]和木兰花碱^[23]是酸枣仁中含量较高的化合物。因此,本实验选择了以上9种成分作为含量测定的指标成分,结果显示,10批酸枣仁饮片汤剂中9种指标成分的质量分数波动范围较小,乌药碱0.25~0.27 mg/g、木兰花碱3.2~3.6 mg/g、维采宁0.077~0.084 mg/g、斯皮诺素0.82~0.89 mg/g、当药黄素0.007 6~0.008 5 mg/g、山柰酚-3-*O*-芸香糖苷0.057~0.060 mg/g、6"-阿魏酰斯皮诺素0.32~0.35 mg/g、酸枣仁皂苷A 0.83~0.91 mg/g、酸枣仁皂苷B 0.095~0.110 mg/g。该制备工艺稳定可控。考虑到原料质量差异的影响,参考文献报道^[24],将酸枣仁饮片汤剂指标成分含量范围设置为均值的70%~130%。

3.4 小结

本实验建立了酸枣仁饮片汤剂指纹图谱结合多成分定量,“全息成分”结合“指标成分”,宏观评价结合微观评价的整体质量控制模式。酸枣仁饮片汤剂制备工艺稳定,质量评价方法可靠,为含有酸枣仁的中药复方制剂质量评价提供科学依据,同时也为其他中药饮片汤剂的质量标准制定提供有益的参考。

参考文献

- [1] 赵曼佳,赵 嵘,代云桃,等. 大黄标准汤剂质量评价[J]. 中国中药杂志,2018,43(5): 861-867.
- [2] 冯文杰,贾晓斌,刘 丹. 影响煎煮汤剂质量的多因素分析及规范化管理研究[J]. 中草药,2014,45(16): 2422-2426.
- [3] 王广伟. 基于果蝇为模式生物的酸枣仁冻干粉改善睡眠作用的实验研究[D]. 哈尔滨:黑龙江中医药大学,2009.
- [4] 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.
- [5] 杨守娟. 酸枣仁与滇枣仁镇静催眠作用成分-皂苷及黄酮苷含量的比较研究[J]. 辽宁中医杂志,2006,33(1): 105.
- [6] 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.
- [7] 陆 华. 卫生部公布的87种药食同源品种的药性和食性与五行分类研究[J]. 光明中医,2013,28(7): 1493-1494.
- [8] Singh A, Zhao K. Treatment of insomnia with traditional

- Chinese herbal medicine [J]. *Int Rev Neurobiol*, 2017, 135: 97-115.
- [9] 杨立伟,王海南,耿 莲,等. 基于标准汤剂的中药整体质量控制模式探讨[J]. 中国实验方剂学杂志,2018,24(8): 1-6.
- [10] 陈士林,刘 安,李 琦,等. 中药饮片标准汤剂研究策略[J]. 中国中药杂志,2016,41(8): 1367-1375.
- [11] 刘苗苗,叶利春,陈立军,等. 真空冷冻干燥技术在中药研究中的应用[J]. 中药材,2014,37(5): 909-911.
- [12] 何 丹,张舒涵,王佳凤,等. 千年健 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中草药,2018,49(5): 1165-1168.
- [13] 吕邵娃,赵 敏,赵 爽,等. 线叶菊有效部位 HPLC 特征图谱研究及5种成分含量测定[J]. 中草药,2018,49(5): 1160-1164.
- [14] 刘 娟,钟瑞娜,刘 肖,等. 一测多评法在肝能滴丸质量控制中的应用研究[J]. 中草药,2018,49(5): 1075-1080.
- [15] 李 响,白雪,何 毅,等. 香橘乳癖宁胶囊 UPLC 特征指纹图谱研究[J]. 中草药,2018,49(2): 346-352.
- [16] 张可佳,孙宁宁,杨 雪,等. UPLC 结合化学计量学方法的胡黄连指纹图谱研究[J]. 中草药,2018,49(3): 685-693.
- [17] 闫 艳,李 强,杜晨晖,等. 基于体内-体外物质组关联分析酸枣仁潜在效应物质[J]. 药学报,2017,52(2): 283-290.
- [18] 李 强,杜晨晖,张 敏,等. 血清化学与网络药理学关联研究酸枣仁的体内效应成分[J]. 中草药,2017,48(10): 1936-1943.
- [19] 鲍康德,赵继红,齐炼文. SPE-HPLC-DAD 同时测定大鼠血浆中斯皮诺素和6"-阿魏酰斯皮诺素的含量[J]. 中国现代应用药学,2013,30(7): 707-711.
- [20] 张亚青,李 莎,汪 洋,等. 生酸枣仁总黄酮的提取及 HPLC 法同时测定斯皮诺素和6"-阿魏酰斯皮诺素[J]. 江苏农业科学,2017,45(23): 198-202.
- [21] 宋 伟,唐生安,曹冰雁,等. 酸枣仁黄酮部位不同配伍的解郁安神作用及谱-效相关性分析[J]. 中草药,2018,49(5): 1123-1131.
- [22] Yang B, Yang H S, Chen F, et al. Phytochemical analyses of *Ziziphus jujuba* Mill. var. *spinosa* seed by ultrahigh performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry and gas chromatography-mass spectrometry [J]. *Analyst*, 2013, 138(22): 6881-6888.
- [23] 胡彦周,丁 轲,韩 涛,等. 酸枣仁微量生物碱成分的筛查方法研究[J]. 天然产物研究与开发,2017,29(7): 1165-1170.
- [24] 沈晓宇,刘雪松,毕宇安,等. 盐补骨脂标准汤剂质量评价体系的建立[J]. 中草药,2018,49(1): 100-108.