

淡附片炮制前后色泽及水煎液中化学成分变化研究

邓 畅, 成 铭, 薛 蓉, 张科卫*, 陆兔林, 毛春芹
(南京中医药大学药学院, 江苏 南京 210023)

摘要: 目的 考察淡附片炮制前后色泽及水煎液中化学成分的变化。方法 采用分光测色计采集炮制前后颜色参数, 建立判别模型, HPLC法建立炮制前后水煎液指纹图谱, 分析相关成分变化。结果 淡附片炮制前后 L^* 、 a^* 、 b^* 有显著差异。HPLC 指纹图谱中指出苯甲酰新乌头碱、苯甲酰乌头原碱、苯甲酰次乌头碱、新乌头碱、乌头碱、次乌头碱、甘草苷, 炮制前后均有 25 个共有峰。与炮制前比较, 炮制后保留了 21 种成分, 产生了 4 种新成分 (有 1 种是甘草苷), 减少了 1 种成分。结论 淡附片炮制前后色泽及水煎液中化学成分均有明显差异, 可为该药材质量控制提供参考。

关键词: 淡附片; 炮制; 色泽; 水煎液; 化学成分; 分光测色计; HPLC 指纹图谱

中图分类号: R283 **文献标志码:** B **文章编号:** 1001-1528(2022)10-3382-04

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2022.10.060

附子为毛茛科植物乌头 *Aconitum carmichaelii* Debx. 的子根的加工品, 其性味辛、甘、大热, 功效回阳救逆、补火助阳、散寒止痛等^[1], 主要含有生物碱、黄酮、多糖^[2-4]等成分, 具有抗心律失常、提高免疫、抗炎、镇痛^[5-7]等药理活性。目前, 对附子成分的研究主要集中在生物碱, 而且大多对药材或相关饮片用有机溶剂超声提取后进行分析, 鲜有涉及其水溶性物质。一般来说, 传统中药都是以水煎煮制成汤剂后入药, 故为了保证临床用药安全有效, 本实验对淡附片炮制前后水煎液化学成分进行分析, 同时对其颜色进行客观量化研究, 以期为该药材质量控制提供参考。

1 材料

高效液相色谱仪, 配置 PDA 检测器、Empower 工作站 (型号 Waters e2695, 美国 Waters 公司); 分光测色计 (型号 CM-5, 日本柯尼卡美能达公司); 电子分析天平 (型号 AG285, 瑞士梅特勒-托利多公司); 高速离心机 (型号 H1650-W, 湖南湘仪实验室仪器开发有限公司); 超声波清洗器 (型号 KQ-500E, 昆山市超声仪器有限公司)。

苯甲酰新乌头碱 (批号 111795-201604)、苯甲酰乌头原碱 (批号 111794-201705)、苯甲酰次乌头碱 (批号 111796-201705)、乌头碱 (批号 110720-201111) 对照品均购于中国食品药品检定研究院; 新乌头碱 (批号 19022202)、甘草苷 (批号 Y12A8H41703)、次乌头碱 (批号 19050902) 对照品均购于上海源叶生物科技有限公司, 纯度均 $\geq 98\%$ 。甲醇、乙腈为色谱纯 (德国 Merck 公司); 其他试剂均为分析纯; 水为纯净水 (娃哈哈集团有限公司)。

生附子共 10 批, 由四川江油中坝附子科技发展有限公司提供 (产地云南、四川, 编号 BEFORE-01~BEFORE-10); 甘草饮片购于南京先声药店; 黑豆 (批号 994202224) 购于苏果超市有限公司, 经南京中医药大学中药资源鉴定专家陈建伟教授鉴定为正品, 均符合 2020 年版《中国药典》要求。

2 方法与结果

2.1 炮制品制备 参照 2020 年版《中国药典》附子项下“淡附片”炮制方法, 编号 AFTER-01~AFTER-10。

2.2 炮制前后色泽量化研究

2.2.1 色泽测定 采用分光测色计对炮制前后色泽进行客观综合评价, 每批样品取 3 份, 每份测定 3 次, 取平均值, 采用 SPSS 21.0 软件进行数据分析, 并建立鉴别模型。选择颜色参数 L^* 、 a^* 、 b^* 进行考察, 分别代表亮度、红绿色度值、黄蓝色度值^[8], L^* 越大, 明度越大, 越感到白; a^* 越大, 颜色越偏红; b^* 越大, 颜色越偏黄。

2.2.2 测定条件 光源 D65; 照明系统 SCE; 口径 8 mm; 区域 30 mm; 检测波长 360~740 nm; 标准观察角度 10°。

2.2.3 方法学考察

2.2.3.1 精密度试验 取同一批样品, 在“2.2.2”项条件下测定 6 次, 测得 L^* 、 a^* 、 b^* RSD 均小于 1.39%, 表明仪器精密度良好。

2.2.3.2 稳定性试验 取同一批样品, 采用连续开机及每次测量后均关机的方法, 于 0、2、4、6、8、12、24 h 在“2.2.2”项条件下测定, 测得 L^* 、 a^* 、 b^* RSD 均小于 1.24%, 表明样品在 24 h 内稳定性良好。

2.2.3.3 外界光亮强度对色泽测定稳定性的影响 取同一

收稿日期: 2021-05-30

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2018YFC1707000)

作者简介: 邓 畅 (1994—), 女, 硕士, 从事中药炮制与饮片质量标准研究。Tel: (025) 85811522, E-mail: dchang929@163.com

* 通信作者: 张科卫 (1971—), 女, 博士, 副教授, 从事中药炮制与饮片质量标准研究。Tel: (025) 85811522, E-mail: kewe1_31@163.com

批样品,同一天内在6:00、9:00、12:00、15:00、18:00、21:00在“2.2.2”项条件下测定,测得 L^* 、 a^* 、 b^* RSD均小于1.21%,表明不同外界光亮强度对测定结果影响不大,方法稳定性良好。

2.2.4 色泽值参考范围建立 采用SPSS 21.0软件对炮制前后颜色数据进行分析,通过探索性分析进行多元正态性检验,以 $P>0.05$ 为符合正态分布的检验标准,发现数据不满足多元正态分布,故参考值范围选择百分位数法,以中位数为标准色值,建立标准色差值 ΔE ,计算公式为 $\Delta E = [(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{1/2}$,其中 ΔL^* 、 Δa^* 、 Δb^* 是各颜色参数最大值与中位数的差值。

采用描述性统计分析中的频数统计法,计算颜色参数P5、P95百分数指标,得到两者双侧90%区间的色值范围,结果见表1。由此可知,在90%色泽值范围内 L^* 、 a^* 、 b^* 均存在差异表明炮制前后色泽存在很大差异。

表1 炮制前后颜色标准范围

指标	参数	炮制前	炮制后
90%参考范围	L^*	71.37~73.16	56.00~62.62
	a^*	1.93~2.14	2.27~4.09
	b^*	11.01~11.69	11.35~15.10
	中位数	72.55,2.00,11.24	60.95,2.45,12.39
标准色差	ΔE	0.77	3.58

2.2.5 多组比较秩和检验 为了验证所建立的颜色范围的合理性,采用非参数检验项下独立样本检验对炮制前后颜色数据进行统计分析。结果,秩和检验、中位数检验中 L^* 、 a^* 、 b^* 的 P 值均小于0.001,故拒绝 H_0 ,接受 H_1 ,可对炮制前后颜色变化进行客观比较。

2.2.6 秩相关 由于炮制前后原始颜色数据不满足正态分布,故采用秩相关分析。结果, L^* 、 a^* 、 b^* Spearman 相关系数分别为-0.114、-0.212、-0.318,双侧 P 值分别为0.550、0.261、0.087,故接受 H_0 。可认为炮制前后三者之间无相关性,即色值有明显差异。

2.2.7 判别分析 将采集到的数据进行分类,其中1类(Y_1)炮制前,2类(Y_2)为炮制后,采用判别分析建立以颜色数据来表征的Fisher线性判别函数,分别为 $Y_1 = 156.993L^* + 616.420a^* - 119.307b^* - 5631.018$ 、 $Y_2 = 133.832L^* + 521.381a^* - 96.583b^* - 4141.005$,将炮制前后样品的颜色参数代入上述判别函数中计算 Y_1 、 Y_2 ,如果前者数值较大,则为炮制前样品;如果后者数值较大,则为炮制后样品,结果见表2。由此可知,炮制前后判别函数正确率均为100%,即该模型可对交叉验证中所有案例进行正确分类,准确率良好。

2.3 HPLC 指纹图谱建立

2.3.1 色谱条件 Agilent TC-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm);流动相乙腈(A)-0.04 mol/L 醋酸铵(B),梯度洗脱(0~6 min, 5~13% A; 6~10 min, 13~16% A; 10~24 min, 16~18% A; 24~25 min, 18~23% A; 25~

表2 判别分析结果

分组	函数	类别	预测值		总计
			1	2	
原始验证	计数	1	30	0	30
		2	0	30	30
		判别率/%	100	0	100
交叉验证	计数	1	30	0	30
		2	0	30	30
		判别率/%	100	0	100
		2	0	100	100

44 min, 23% A; 44~54 min, 23~32% A; 54~76 min, 32~50% A; 76~82 min, 50~83% A; 82~85 min, 83~100% A);体积流量1.0 mL/min;柱温30℃;检测波长235 nm;进样量10 μL。

2.3.2 对照品溶液制备 精密称取苯甲酰新乌头碱、苯甲酰乌头原碱、苯甲酰次乌头碱、新乌头碱、乌头碱、次乌头碱、甘草苷对照品适量,制成质量浓度分别为60.92、9.90、9.92、5.79、4.91、4.52、24.10 μg/mL的溶液,即得。

2.3.3 供试品溶液制备 取本品约5 g,精密称定,放入砂锅中,加50 mL水煎煮30 min,滤过,蒸干滤液,残渣中加入3 mL氨试液,精密加入50 mL异丙醇-乙酸乙酯(1:1)混合溶液,称定锥形瓶质量,超声(功率300 W,频率40 kHz,水温25℃以下)处理30 min,放冷,上述混合溶液补足减失的质量,摇匀,滤过,精密量取25 mL滤液,减压回收溶剂至干(温度低于40℃),将残留物溶于3 mL上述混合溶液中,滤过,取滤液,即得。

2.3.4 方法学考察

2.3.4.1 空白实验 精密吸取异丙醇-二氯甲烷(1:1)混合溶液10 μL,在“2.3.1”项色谱条件下进样测定,发现溶液对测定结果无干扰。

2.3.4.2 精密度试验 精密称取炮制前后样品(BEFORE-01、AFTER-01)适量,按“2.3.3”项下方法制备供试品溶液,在“2.3.1”项色谱条件下各进样测定6次,以苯甲酰新乌头碱为参照,测得炮制前后各共有峰相对保留时间、相对峰面积RSD均小于1.61%,表明仪器精密度良好。

2.3.4.3 重复性试验 精密称取炮制前后样品(BEFORE-01、AFTER-01)各6份,按“2.3.3”项下方法制备供试品溶液,在“2.3.1”项色谱条件下进样测定,以苯甲酰新乌头碱为参照,测得炮制前后各共有峰相对保留时间、相对峰面积RSD均小于1.34%,表明该方法重复性良好。

2.3.4.4 稳定性试验 精密称取炮制前后样品(BEFORE-01、AFTER-01)适量,按“2.3.3”项下方法制备供试品溶液,于0、2、4、6、8、12、24 h在“2.3.1”项色谱条件下进样测定,以苯甲酰新乌头碱为参照,测得炮制前后各共有峰相对保留时间、相对峰面积RSD均小于1.58%,表明溶液在24 h内稳定性良好。

2.3.5 图谱生成及相似度评价 取炮制前后样品各10批,

按“2.3.3”项下方法制备供试品溶液，在“2.3.1”项色谱条件下进样测定，将其色谱图导入“中药色谱指纹图谱相似度评价软件”（2012版），作为参照图谱，采用平均数法、多点校正、色谱峰匹配，见图1~3，再进行相似度分析，结果见表3。由此可知，炮制前后10批样品指纹图谱相似度均分别大于0.90、0.95，表明同一批样品色谱峰基本相似。

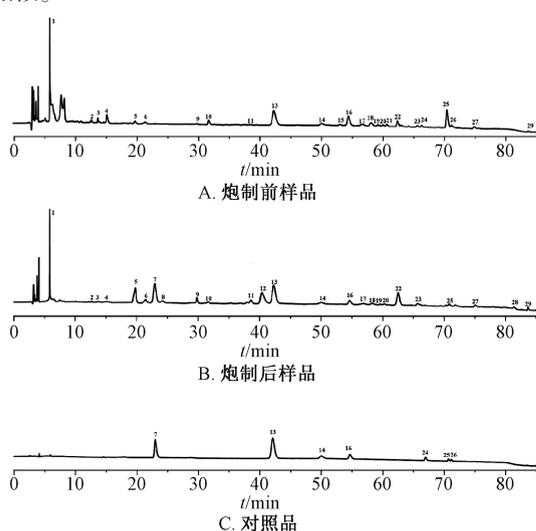


图1 炮制前后共有模式图和对照品溶液 HPLC 色谱图

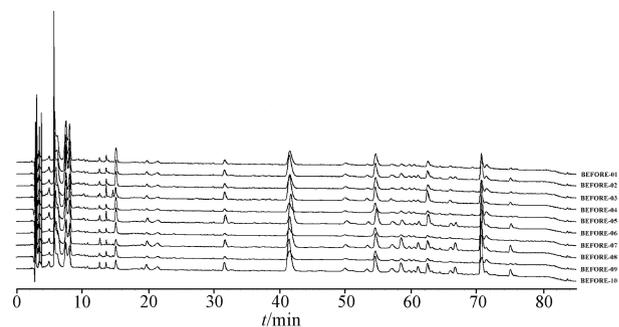


图2 炮制前10批样品 HPLC 指纹图谱

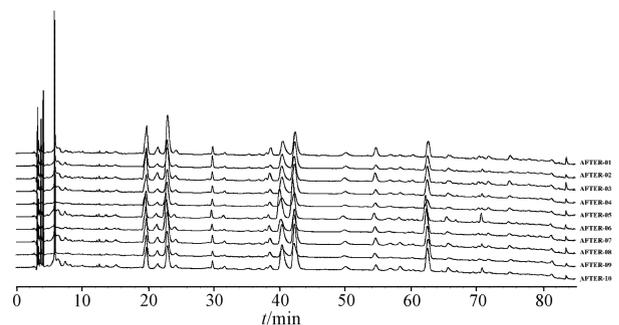


图3 炮制后10批样品 HPLC 指纹图谱

另外，炮制前后 HPLC 指纹图谱中均有 25 个共有峰，其中 21 个为炮制前后均存在（峰 1~6、9~11、13、14、16~20、22、23、25、27、29），15 号峰为炮制前样品特征峰，7、8、12、28 号峰为炮制后样品特征峰（其中 7 号峰为甘草苷），7、13、14、16、24、25、26 号峰分别为甘草

表3 炮制前后各批样品相似度

编号	相似度	编号	相似度
BEFORE-01	0.943	AFTER-01	0.960
BEFORE-02	0.915	AFTER-02	0.951
BEFORE-03	0.921	AFTER-03	0.997
BEFORE-04	0.907	AFTER-04	0.959
BEFORE-05	0.977	AFTER-05	0.964
BEFORE-06	0.902	AFTER-06	0.957
BEFORE-07	0.964	AFTER-07	0.992
BEFORE-08	0.949	AFTER-08	0.975
BEFORE-09	0.995	AFTER-09	0.989
BEFORE-10	0.945	AFTER-10	0.974

苷、苯甲酰新乌头碱、苯甲酰乌头碱、苯甲酰次乌头碱、新乌头碱、乌头碱、次乌头碱。综上所述，炮制后水煎液中化学成分发生了变化，产生了特有成分，但同时也保留了炮制前大部分成分。

3 讨论

3.1 研究必要性 目前，国内外文献尚未涉及淡附片炮制前后水煎液，有学者尝试建立其特征图谱，但仅研究了70%甲醇提取部位^[3]。附子为有毒中药，为了保证其安全有效，需对其水煎液进行研究。

3.2 提取条件优化 附子生物碱既是有毒成分，又是有效成分，故本实验对其进行研究，并对提取方法、提取溶剂、提取时间、提取次数、液料比进行考察，最终确定为“2.3.3”项下提取条件。

3.3 色谱条件优化 本实验比较了流动相甲醇-水、乙腈-水、甲醇-0.04 mol/L 醋酸铵、乙腈-0.04 mol/L 醋酸铵等及不同梯度洗脱程序，考察了不同柱温、进样量、色谱柱对各成分色谱行为的影响，最终确定为“2.3.1”项下色谱条件。

4 结论

分光测色计可量化传统的色泽描述指标，避免了传统色泽鉴别中的主观因素干扰，已被广泛应用于食品、中药、牙科材料等多个领域^[9-12]，而在中药方面往往用于不同炮制品、不同产地药材的色泽分析^[13-15]。本实验采用该仪器来建立能客观评价淡附片炮制前后色泽的模型，从而为客观评价该药材质量提供了依据，同时也对临床用药安全性进行了有益的探索。

然后，本实验分析了淡附片炮制前后水煎液中化学成分的差异，发现产生了7、8、12、28号峰（其中7号峰为甘草苷），并且15号峰未检出，推测可能是加水、加热、辅料炮制等因素所致^[16]。

参考文献：

[1] 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，2020：200-201.
[2] 雷崎方，孙桂波，沈寿茂，等. 附子的化学成分研究[J]. 中草药，2013，44(6)：655-659.
[3] 国伟，谭鹏，秦语欣，等. 淡附片 HPLC 特征图谱的研究及炮制前后比较[J]. 中华中医药杂志，2015，30(8)：

- 2968-2970.
- [4] 吕永磊, 王 丹, 李向日, 等. 附子多糖的含量测定[J]. 药物分析杂志, 2011, 31(5): 835-838.
- [5] 吴环宇, 许妍妍, 卢志强, 等. 黑顺片血浆指纹图谱与抗心衰作用的谱效关系研究[J]. 中草药, 2015, 46(6): 861-865.
- [6] 唐 锋, 梁少瑜, 陈飞龙, 等. 血清药物化学和血清药理学相结合的方法探讨麻黄附子细辛汤抗炎和免疫抑制的物质基础[J]. 中国中药杂志, 2015, 40(10): 1971-1976.
- [7] 熊秋韵, 李梦婷, 缪璐琳, 等. 附子不同炮制品抗炎、镇痛和提高免疫功能作用的比较研究[J]. 中药药理与临床, 2017, 33(1): 123-127.
- [8] 何晓凤, 王露露, 张 晶. 基于色度学原理的颜色分析方法在药物研究领域的应用概况[J]. 药物分析杂志, 2018, 38(9): 1471-1475.
- [9] Guo F Q, Yang C Y, Zang C, et al. Comparison of the quality of Chinese ginger juice powders prepared by different drying methods[J]. *J Food Process Eng*, 2019, 42(7): e13252.
- [10] McDermott A, Visentin G, McParland S, et al. Effectiveness of mid-infrared spectroscopy to predict the color of bovine milk and the relationship between milk color and traditional milk quality traits[J]. *J Dairy Sci*, 2016, 99(5): 3267-3273.
- [11] Xue R, Deng C, Cao H H, et al. Quality assessment of raw and baked *Aucklandia lappa* Decne. by color measurement and fingerprint analysis [J]. *J Sep Sci*, 2020, 43(15): 3017-3026.
- [12] Brooksbank A, Owens B M, Phebus J G, et al. Surface sealant effect on the color stability of a composite resin following ultraviolet light artificial aging[J]. *Oper Dent*, 2019, 44(3): 322-330.
- [13] Fei C H, Dai H, Wu X Y, et al. Quality evaluation of raw and processed *Crataegi Fructus* by color measurement and fingerprint analysis[J]. *J Sep Sci*, 2018, 41(2): 582-589.
- [14] 李 旻, 陈美君, 潘欢欢, 等. 基于颜色客观化的陈皮药材鉴别[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(18): 31-34.
- [15] 干 丽, 钟如帆, 魏 梅, 等. 狗脊炮制工艺优选及色度值测定[J]. 中成药, 2020, 42(9): 2382-2388.
- [16] 王峰峰, 宋兆辉, 张兰兰, 等. 乌头碱、新乌头碱、次乌头碱水解和醇解产物的研究[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(11): 1564-1569.

镁螯合肥对当归生长、产量及品质的影响

刘莉莉, 晋小军*, 贾袭伟

(甘肃农业大学农学院, 甘肃省中药材规范化生产技术创新重点实验室, 甘肃 兰州 730070)

摘要: 目的 研究镁螯合肥对当归生长、产量及品质的影响。方法 以清水为对照, 采用单因子随机区组设计, 设置4个浓度镁螯合肥(稀释400、800、1 200、1 600倍)分别喷施当归, 观察测定当归生长理化指标及产量品质, 确定适宜当归生长的镁螯合肥喷施浓度。结果 喷施稀释800倍镁螯合肥时, 当归生长指标表现最佳, 叶绿素相对含量、净光合速率、气孔导度最大, 鲜产量达24 163.84 kg/hm², 醇溶性浸出物、挥发油、阿魏酸、藁本内酯含量分别达到64.3%、0.593%、0.127%、0.279%。结论 镁螯合肥可显著影响当归生长及产量品质。

关键词: 当归; 镁螯合肥; 生长; 产量; 品质

中图分类号: R282

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2022)10-3385-05

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2022.10.061

当归是伞形科植物当归 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels 的干燥根^[1], 始载于《神农本草经》^[2], 它作为常用妇科之要药, 具有活血补血、调经止痛、润肠通便的功效, 素有“十方九归”之美誉^[3-6], 主产于甘肃岷县及周边地区, 并以“岷归”著称^[7]。近年来, 当归需求量显著增加, 但因道地性所限, 盲目扩大栽培面积存在较大风险。

施肥是有效促进植物生长和提高产量质量的主要途径, 施肥种类及用量的选择对药材产量品质影响至关重要。杨少华^[2]等研究氮磷钾施肥量对当归产量的影响, 马中森等^[8]研究轮作周期及新型肥料对当归抗病性、产量及品质的影响, 席旭东等^[9]研究硒元素对当归产量质量的影响。目前对当归施肥的研究大多集中在氮磷钾, 而鲜有中、微

收稿日期: 2021-02-01

基金项目: 当归新品种引进及规范化栽培关键技术研究推广项目(2019-HZ-817); 贫困地区精准扶贫中药材产业技术与示范推广项目(2019)

作者简介: 刘莉莉(1994—), 女, 硕士, 从事药用植物资源与利用研究。Tel: 18893793076, E-mail: 2659003200@qq.com

* **通信作者:** 晋小军(1965—), 男, 研究员, 从事药用植物资源与利用教学及研究工作。Tel: (0931) 7631145, E-mail: jingxj@gsau.edu.cn