

· 工艺与制剂 ·

桃仁焯制机制探讨

许亚韬，孙飞，孟江，王淑美，梁生旺*
(广东药学院，广州 510006)

〔摘要〕 目的:通过比较不同桃仁炮制品的苦杏仁酶活性、苦杏仁苷含量及其毒性大小,探究桃仁的焯制机制。方法:通过苦味酸试纸变色反应测定桃仁中苦杏仁酶的活性。采用 HPLC 测定不同桃仁炮制品中苦杏仁苷含量,流动相乙腈-0.1% 磷酸水(15:85),检测波长 210 nm。利用急性毒性试验比较桃仁不同炮制品的毒性大小。结果:生桃仁可使苦味酸试纸变为红色,焯桃仁不变色。生桃仁中苦杏仁苷质量分数 3.48%,贮藏 6 个月后苦杏仁苷含量明显降低至 2.53%;焯桃仁中苦杏仁苷质量分数(3.19%)较生桃仁略低,贮藏 6 个月后苦杏仁苷含量(3.10%)变化不显著。焯桃仁(未去皮)水提物的半数致死量(LD₅₀)55.907 g·kg⁻¹,焯桃仁(去皮)水提物的 LD₅₀ 82.943 g·kg⁻¹。结论:桃仁经焯制后会苦杏仁酶完全灭活,可防止有效成分苦杏仁苷因酶解而损失。桃仁焯制后去皮可降低毒性,提示桃仁焯后去皮的炮制方式具有合理性,应按照传统焯后去皮用,为桃仁炮制工艺研究及炮制技术规范提供参考。

〔关键词〕 焯桃仁; 苦杏仁苷; 苦杏仁酶; 急性毒性试验; 半数致死量
〔中图分类号〕 R283.1;R285.5;R282.71 〔文献标识码〕 A 〔文章编号〕 1005-9903(2014)22-0001-04
〔doi〕 10.13422/j.cnki.syfjx.2014220001

Analysis on Processing Mechanism of Persicae Semen

XU Ya-tao, SUN Fei, MENG Jiang, WANG Shu-mei, LIANG Sheng-wang*
(Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China)

〔Abstract〕 **Objective:** By comparing activity of emulsin, the content of amygdalin in different processed products and their toxicity, to explore processing mechanism of Persicae Semen. **Method:** Activity of emulsin in Persicae Semen was determined by picric acid test. The content of amygdalin in different processed products was determined by HPLC, mobile phase was acetonitrile-0.1% H₃PO₄ and detection wavelength was set at 210 nm. Toxicity of different processed products was compared by acute toxicity experiment. **Result:** Crude products of Persicae Semen could make picric acid test turn red while processed products could not change. The content of amygdalin in crude products was 3.48% and significantly decreased to 2.53% after six months; the content of amygdalin in processed products (3.19%) was lower and decreased to 3.10% after six months. LD₅₀ of water extract of processed products was 55.907 g·kg⁻¹ which were not peeled, it was 82.943 g·kg⁻¹ when processed products were peeled. **Conclusion:** Emulsin in Persicae Semen is inactivity after being processed, amygdalin is prevented from enzymolysis and loss. Toxicity of Persicae Semen is reduced after processed and peeled, processed products should be peeled to be used. This study can provide a reference for processing technology research and specification of Persicae Semen.

〔Key words〕 Persicae Semen; amygdalin; emulsin; acute toxicity experiment; LD₅₀

桃仁具有活血祛瘀、润肠通便、止咳平喘之功效^[1]。该药味炮制方法较多,主要包括焯法、炒法、

〔收稿日期〕 20140629(002)
〔基金项目〕 国家中医药管理局中医药行业科研专项(201207004-7)
〔第一作者〕 许亚韬,在读硕士,从事中药质量控制研究,Tel:13632252683,E-mail:xuyt_2009@163.com
〔通讯作者〕 *梁生旺,博士生导师,教授,从事中药质量控制研究,Tel:020-39352172,E-mail:swliang371@163.com

蒸法等,其中**煨**制始见于汉代张仲景的《金匱玉函经》,记曰:“去皮尖”或“须泡去皮乃熬”^[2]。

目前临床上**煨**桃仁较为常用,但关于桃仁的**煨**制机制,学术界争论较多。吕文海等^[3]研究报道桃仁**煨**制有利于有效成分溶出,而马新华等^[4]指出桃仁粉碎后**煨**制并不能增加有效成分的溶出。关于桃仁**煨**后是否去皮,文献^[5]认为**煨**后去皮可去除非药用部位;但卜永春等^[6]研究发现桃仁皮具有抗凝血、抗血栓等药理作用;此外,马新华等^[4]认为桃仁**煨**去皮有利于避免发生中毒事故,故有必要对桃仁**煨**制机制进行系统研究。苦杏仁苷作为桃仁的主要有效成分之一,功效活血化瘀、镇咳祛痰,具有抗凝血、抗血栓,抗纤维化等活性。

本实验拟通过比较生、**煨**桃仁中苦杏仁酶活性及苦杏仁苷含量来阐明桃仁**煨**制的合理性,结合急性毒性试验探讨桃仁**煨**后是否去皮的问题,为桃仁的临床用药安全提供参考。

1 材料

BP211D 型 1/10 万电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司),AY-120 型 1/1 万分析天平和 LC-20A 型高效液相色谱仪(日本岛津)。

桃仁药材购于广州市清平药材市场,经广东药学院中药学院李书渊教授鉴定为蔷薇科植物桃 *Prunus persica* 的干燥成熟种子;苦杏仁苷对照品(中国食品药品检定研究院,批号 110820-201004),羧甲基纤维素钠(CMC-Na,广州器化医疗设备有限公司),乙腈、甲醇均为色谱纯,水为超纯水,其他试剂均为分析纯。SPF 级昆明种小鼠,18~22 g,雌雄各半,购于广州中医药大学动物实验中心,合格证号 SCXK(粤)2013-0020。

2 方法与结果

2.1 不同炮制品的制备 取桃仁药材,拣去杂质,得生桃仁。取净桃仁适量,置沸水中不断翻动 10 min,捞出至冷水中稍浸,取出,低温干燥,得**煨**桃仁(未去皮)。取净桃仁适量,置沸水中不断翻动 10 min,捞出至冷水中稍浸,取出,去皮,低温干燥,得**煨**桃仁(去皮)。

2.2 苦杏仁酶活性检验 分别取不同桃仁炮制品,粉碎过二号筛,称取粉末 0.2 g 置于具塞试管中,加水数滴使之湿润,在试管口悬挂一条用饱和碳酸钠试液润湿过的苦味酸试纸,塞紧试管口,将试管置水浴中加热 15 min,观察试纸颜色变化,结果发现生桃仁组样品于 1 min 内试纸由橙黄色变为砖红色,**煨**桃仁组在 15 min 内苦味酸试纸均不变色。

2.3 苦杏仁苷的含量测定

2.3.1 色谱条件 Luna 5u C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm,5 μm),流动相乙腈-0.1% 磷酸水(15:85),柱温 35 ℃,检测波长 210 nm,流速 1.0 mL·min⁻¹,进样量 10 μL。

2.3.2 对照品溶液的制备 精密称取苦杏仁苷对照品适量,加 70% 甲醇制成每 1 mL 含苦杏仁苷 40 μg 的溶液,即得。

2.3.3 供试品溶液的制备^[1] 精密称取本品粗粉约 0.3 g,置具塞锥形瓶中,加入石油醚(60~90 ℃) 50 mL,加热回流 1 h,放冷,弃去石油醚;药渣及滤纸挥干溶剂,放入原锥形瓶中,精密加入 70% 甲醇 50 mL,称定质量,加热回流 1 h,放冷,用 70% 甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过。精密量取续滤液 5 mL 至 20 mL 量瓶中,加 50% 甲醇稀释至刻度,摇匀,即得。

2.3.4 线性关系考察 精密吸取 43.16 mg·L⁻¹ 苦杏仁苷对照品溶液 2,4,8,12,16,20 μL,按 **2.3.1** 项下色谱条件测定,以峰面积积分值为纵坐标,进样量为横坐标,得回归方程 $Y = 765\,956X - 5\,313.6$ ($r = 0.999\,9$),线性范围 0.086 32~0.863 2 μg。

2.3.5 精密度试验 取同一对照品溶液按 **2.3.1** 项下方法重复进样 6 次,计算苦杏仁苷峰面积的 RSD 1.1%,表明仪器精密度良好。

2.3.6 稳定性试验 取同一供试品溶液,分别于 0,2,4,8,12,24 h 按 **2.3.1** 项下方法进样,计算苦杏仁苷峰面积的 RSD 0.31%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.3.7 重复性试验 取同一批桃仁药材 6 份,按 **2.3.3** 项下方法制备供试品溶液,按 **2.3.1** 项下方法测定,计算苦杏仁苷平均质量分数 3.46%,RSD 0.49%,表明该方法重复性良好。

2.3.8 加样回收率试验 精密称取苦杏仁苷对照品适量,加 70% 甲醇制成 1.001 g·L⁻¹ 的对照品溶液。精密量取已知含量的桃仁药材粗粉约 0.15 g,共 6 份,各精密加入苦杏仁苷对照品溶液 5 mL,按 **2.3.3** 项下方法制备供试品溶液,按 **2.3.1** 项下方法测定,计算加样回收率,结果见表 1,表明该方法准确可靠。

2.3.9 样品测定 称取桃仁各炮制品粗粉约 0.3 g,按 **2.3.3** 项下方法制备供试品溶液,按 **2.3.1** 项下方法测定,结果生桃仁、**煨**桃仁、生桃仁(贮存 6 个月)、**煨**桃仁(贮存 6 个月)、桃仁皮中苦杏仁苷质量分数分别为 3.48%,3.19%,2.53%,3.10%,0.21%。

表 1 苦杏仁苷含量测定的加样回收率试验

No.	取样量 /g	样品中 量/mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
1	0.149 8	5.176	10.19	100.18	99.76	2.9
2	0.149 3	5.158	10.32	103.14		
3	0.149 9	5.179	10.19	100.12		
4	0.150 1	5.186	9.99	95.98		
5	0.150 1	5.186	10.32	102.58		
6	0.149 3	5.158	9.99	96.54		

注:加入量均为 5.005 mg。

2.4 急性毒性试验

2.4.1 不同桃仁炮制品溶液的制备 精密称取焯桃仁(未去皮)、焯桃仁(去皮)2 种粗粉各 500 g,分别加 8 倍量水浸泡 30 min,煎煮 30 min 后抽滤,滤渣加 8 倍量水重复煎煮 30 min,抽滤,合并滤液,减压浓缩后真空干燥,分别得浸膏 65.20,69.71 g。取不同桃仁炮制品浸膏粉末,焯桃仁(未去皮)0.654,0.979,1.44,4.31,6.52 g,焯桃仁(去皮)1.39,1.95,5.16,7.11,9.76 g,分别用新制备的 0.5% CMC-Na 配成 0.131,0.196,0.287,0.431,0.652 g·mL⁻¹和 0.279,0.391,0.516,0.711,0.976 g·mL⁻¹的供试液,备用。

2.4.2 半数致死量考察 取小鼠 110 只,按体重随机分成 11 组,每组 10 只,雌雄各半,分别为空白组,焯桃仁(未去皮)水提取物 1,2,3,4,5 组,焯桃仁(去皮)水提取物 1,2,3,4,5 组。在预试验基础上,焯桃仁(未去皮)5 个给药组的组间距(*r*)0.68,各组剂量以生药量计分别为 20.05,30.03,44.04,66.05,100.05 g·kg⁻¹。焯桃仁(去皮)5 个给药组的 *r*=0.73,各组剂量以生药量计分别为 39.98,56.05,74.00,101.99,140.00 g·kg⁻¹。灌胃前禁食 24 h,给药组按 20 mL·kg⁻¹的剂量灌胃给药 1 次,空白组灌胃等体积的 0.5% CMC-Na 溶液。给药后连续观察 6 h,分别于 8,12,24 h 观察 1 次,之后每天至少观察 1 次,并于 1,3,5,7,9,14 d 记录每只小鼠体重。密切观察小鼠的活动、呼吸、毛发、大小便等毒性反应及死亡情况,若有死亡,立即解剖,肉眼观察心、肝、脾、肺、肾、胃、大小肠等主要脏器的变化,连续观察 14 d 并记录动物中毒表现及特点,毒性反应出现时间、毒性反应消失时间及动物死亡时间,观察期结束后将每组存活小鼠处死并解剖,肉眼观察各脏器有无异常。采用 Bliss 法计算半数致死量(LD₅₀),LD₅₀=lg⁻¹[*X_m* - *i*(Σ*p* - 0.5)],式中 *X_m* 为最大剂

量的对数值,*i* 为相邻两组剂量之比的对数,Σ*p* 为各组死亡率之和,*p* 为各组死亡率。

结果空白对照组小鼠自主活动、采食、呼吸、饮水状况、大小便等均无异常。给药组小鼠中毒症状相似,给药后即出现兴奋不安,活动增加,30 min 后自主活动减少,1 h 后出现呼吸急促,腹部贴地,3 h 后出现呼吸困难,痉挛,随后死亡。死亡小鼠立即进行解剖,肉眼观察肺与正常组的相比,略显红色,其他脏器并无异常变化。焯桃仁(未去皮)水提取物的 LD₅₀ = 55.907 g·kg⁻¹,95% 置信区间[43.156,78.213 g·kg⁻¹]。焯桃仁(去皮)水提取物的 LD₅₀ = 82.943 g·kg⁻¹,95% 置信区间[66.855,106.9 g·kg⁻¹]。各组小鼠死亡率见表 2。

表 2 不同桃仁炮制品灌胃给药后各组小鼠死亡率

组别	剂量/g·kg ⁻¹	死亡数/只	死亡率/%
空白	0	0	0
焯桃仁(未去皮)1	20.05	0	0
焯桃仁(未去皮)2	30.03	2	20
焯桃仁(未去皮)3	44.04	4	40
焯桃仁(未去皮)4	66.05	6	60
焯桃仁(未去皮)5	100.05	8	80
焯桃仁(去皮)1	39.98	1	10
焯桃仁(去皮)2	56.05	2	20
焯桃仁(去皮)3	74.00	4	40
焯桃仁(去皮)4	101.99	6	60
焯桃仁(去皮)5	140.00	9	90

3 讨论

桃仁为中医活血化瘀之要药,苦杏仁苷是其主要有效成分之一,该成分为芳香族氰苷,具有抗凝血、抗血小板聚集、抗动脉粥样硬化^[7-8]、免疫抑制^[9]、抗肿瘤^[10]、抗炎^[11]等作用。但在受潮、水浸等情况下,苦杏仁苷易被桃仁自身所含的苦杏仁酶水解产生氢氰酸。苦味酸试纸显色反应能定性鉴别苦杏仁苷酶解产生的氢氰酸,进而反映苦杏仁酶的活性。据本文显色反应结果显示,可推断桃仁焯制具有“杀酶”作用。

经样品测定可知,生桃仁中苦杏仁苷含量高于焯桃仁中该成分含量,与大多数文献报道结果一致^[3-4,12],说明焯制过程会导致桃仁部分水溶性成分的流失,故有研究认为桃仁宜生用,省时省力且避免了有效成分流失。但这仅是从炮制对成分即时影响的角度考虑,而忽略了炮制、贮存两者共同对桃仁中

有效成分的影响。本文通过比较贮存 6 个月前后桃仁生品与制品中苦杏仁苷含量变化,发现贮存后生桃仁苦杏仁苷的含量明显降低,低于同时间段煨桃仁中该成分的含量,而煨桃仁中苦杏仁苷的含量变化不显著。原因可能是煨桃仁含有的苦杏仁苷在长期贮存中因苦杏仁酶早已灭活而未被分解,故含量变化不明显;而生桃仁含有的苦杏仁苷在贮存过程中被自身所含的酶分解而显著降低。因此,从长期贮存考虑,桃仁煨制具有保苷的作用,即桃仁进行煨制具有合理性。

通过对去皮与未去皮煨桃仁的 LD₅₀ 进行比较,发现煨桃仁(未去皮)的毒性大于煨桃仁(去皮),说明煨桃仁去皮具有减毒作用。原因是桃仁的毒性主要由大量苦杏仁苷在体内分解产生氢氰酸所致,但本文研究证明桃仁皮中苦杏仁苷的含量在桃仁中所占比例很小,故推测桃仁皮可能含有其他毒性成分,尚需对桃仁皮中化学成分及其活性进行深入探究。综上所述,桃仁煨后去皮的炮制方式较为合理,符合中药传统炮制作用之“增效减毒”理论,符合历版《中国药典》中桃仁煨制方法,为桃仁炮制工艺研究及炮制技术规范提供了理论依据。提示桃仁的炮制方法应遵循“增效减毒”之理,在药效及毒性间寻找平衡点,以保证有效性及安全性的统一,从而更好地服务于临床用药。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:260.
[2] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草. 精

选本. 上册[M]. 上海:上海科学技术出版社,1998:738,749.
[3] 吕文海,于少华. 桃仁炮制的初步实验研究[J]. 中国中药杂志,1993,18(4):214.
[4] 马新华,熊鹰,贺军. 桃仁炮制研究初探[J]. 黑龙江中医药,1990(6):43.
[5] 龚千峰. 中药炮制学[M]. 北京:中国中医药出版社,2007:274.
[6] 吕文海,卜永春. 桃仁炮制品的初步药理研究[J]. 中药材,1994,17(3):29.
[7] Deng J G, Li C, Wang H, et al. Amygdalin mediates relieved atherosclerosis in apolipoprotein E deficient mice through the induction of regulatory T cells[J]. Biochem Biophys Res Commun,2011,411(3):523.
[8] Deng J G, Wang H L, Liu Y D, et al. Anti-atherosclerotic effects mediated by the combination of probucol and amygdalin in apolipoprotein e-knockout mice fed with a high fat diet[J]. J Anim Vet Adv,2012,11(1):20.
[9] 郭君其,王灵杰,叶永峰,等. 苦杏仁苷对肾脏移植大鼠存活情况的影响[J]. 中国中西医结合肾病杂志,2008,9(1):22.
[10] 连彦军,许天文,郑勇斌,等. 抗 CEA 单抗-β-葡萄糖苷酶偶联物/苦杏仁苷前药系统对裸鼠结直肠癌移植瘤的疗效观察[J]. 华 中 医 学 杂 志,2005,29(1):49.
[11] 邓嘉元,李运曼,鲁林琳. 苦杏仁甙对大鼠慢性胃炎的药效学研究[J]. 中国药科大学学报,2002,33(1):45.
[12] 江双园. 浅谈生桃仁与炮制桃仁在临床的疗效[J]. 中华当代医学,2005,3(5):93.

[责任编辑 刘德文]