

[8]

谭 亮,冀 恬,耿丹丹,等. ASE 快速溶剂萃取与测定青海十六种高寒植物中多糖含量[J]. 天然产物研究与开发, 2014, 26(12): 1992-1999.

[9]

曲云卿,张同刚,刘敦华. 不同产地枸杞中主要类胡萝卜素的聚类分析[J]. 食品与机械, 2015, 31(2): 76-79.

[10]

刘增根,陶燕铎,邵 赟,等. 柴达木枸杞和黑果枸杞中甜菜碱的测定[J]. 光谱实验室, 2012, 29(2): 694-697.

[11]

曹静亚,谭 亮,迟晓峰,等. 柴达木栽培和野生枸杞子中东莨菪内酯含量的测定[J]. 天然产物研究与开发, 2014, 26(12): 2004-2007.

酸枣仁黄酮 HPLC 指纹图谱建立及 2 种成分测定

杨 旭, 冉瑞雪, 宋 伟, 乔 卫*
(天津医科大学药学院, 天津市临床药物关键技术重点实验室, 天津 300070)

摘要: **目的** 建立酸枣仁 *Ziziphi spinosae Semen* 黄酮 HPLC 指纹图谱, 并测定其中 2 种成分的含有量。**方法** 以斯皮诺素为参照峰, 建立 10 批样品的 HPLC 指纹图谱。酸枣仁黄酮甲醇提取物的分析采用 Agilent TC-C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相乙腈-0.1% 醋酸, 梯度洗脱; 体积流量 1 mL/min; 柱温 30 ℃; 检测波长 280 nm。**结果** HPLC 指纹图谱中有 10 个共有峰, 并鉴定出其中 8 个 (维采宁-Ⅱ、牡荆素葡萄糖苷、异斯皮诺素、斯皮诺素、6'''-pyridyloylspinosin、6'''-对羟基苯甲酰斯皮诺素、6'''-阿魏酰斯皮诺素、6'''-对香豆酰斯皮诺素)。斯皮诺素和 6'''-阿魏酰斯皮诺素分别在 15.00 ~ 40.00 μg 和 5.00 ~ 14.00 μg 范围内线性关系良好, 平均加样回收率 (RSD) 分别为 100.5% (1.6%) 和 100.4% (1.6%)。**结论** 该方法准确、简单、可靠, 可用于酸枣仁黄酮的质量控制。**关键词:** 酸枣仁; 黄酮; 斯皮诺素; 6'''-阿魏酰斯皮诺素; HPLC 指纹图谱
中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1528(2017)05-0989-04
doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2017.05.022

Establishment of HPLC fingerprints of flavonoids in *Ziziphi spinosae Semen* and determination of two constituents

YANG Xu, RAN Rui-xue, SONG Wei, QIAO Wei*
(Tianjin Municipal Key Laboratory of Technologies Enabling Development of Clinical Therapeutics and Diagnostics; School of Pharmacy, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China)

ABSTRACT: **AIM** To establish the HPLC fingerprints of flavonoids in *Ziziphi spinosae Semen* and to determine the contents of two constituents. **METHODS** With spinosin as a reference peak, the HPLC fingerprints of ten batches of samples were established. The analysis of methanol extract of flavonoids in *Ziziphi spinosae Semen* was performed on a 30 ℃ thermostatic Agilent TC-C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), with the mobile phase comprising of acetonitrile-0.1% acetic acid flowing at 1 mL/min in a gradient elution manner, and the detection wavelength was set at 280 nm. **RESULTS** There were ten common peaks in the HPLC fingerprints, eight of which (vicenin-Ⅱ, glucosylvitexin, isospinosin, spinosin, 6'''-pyridyloylspinosin, 6'''-p-hydroxybenzoylspinosin, 6'''-feruloylspinosin and 6'''-p-coumaroylspinosin) were identified. Spinosin and 6'''-feruloylspinosin showed good linear relationships within the ranges of 15.00 – 40.00 μg and 5.00 – 14.00 μg, whose average recoveries (RSDs) were 100.5% (1.6%) and 100.4% (1.6%), respectively. **CONCLUSION** This accurate, simple and reliable method can be used for the quality control of flavonoids in *Ziziphi spinosae Semen*.
KEY WORDS: *Ziziphi spinosae Semen*; flavonoids; spinosin; 6'''-feruloylspinosin; HPLC fingerprints

收稿日期: 2016-06-27
基金项目: 国家自然科学基金 (81173530); 天津市自然科学基金重点项目 (12YFJZJC08100)
作者简介: 杨 旭 (1992—), 男, 硕士生, 研究方向为中药质量控制。E-mail: xiaovae201022@163.com
* **通信作者:** 乔 卫 (1968—), 女, 教授, 博士生导师, 研究方向为药效物质基础及作用机制。E-mail: qiaowei@tmu.edu.cn

酸枣仁为鼠李科植物酸枣 *Ziziphus jujuba* Mill var. *spinosa* (Bunge) Huex H. F chou 的干燥成熟种子，在汉代《神农本草经》中被列为上品^[1]，含有脂肪油、皂苷、黄酮、生物碱等多种物质。酸枣仁黄酮具有镇静催眠及抗抑郁活性^[2]，斯皮诺素和 6"-阿魏酰斯皮诺素是其主要成分^[3]，均具有显著药理活性^[4]，故选择其作为指标成分^[5]。本实验拟建立共有峰成分明确的酸枣仁黄酮指纹图谱，并对这 2 种成分的含有量进行检测，以整体控制其质量。

1 试药与仪器

1.1 试药 斯皮诺素（批号 PS12010701）、6"-阿魏酰斯皮诺素（批号 PS13013103）对照品购自成都普思生物科技有限公司（含有量≥98.0%）。酸枣仁购自安徽亳州市怡怡堂精品药材店、天津江山大药房医药连锁有限公司、安国市祁瑞中药材有限公司，经天津医科大学生药教研室周晔教授鉴定为正品。酸枣仁黄酮（自制。制备方法为取酸枣仁 250 g，粉碎后用 70 ℃ 石油醚脱脂 4 h，挥干，粉末用 70% 乙醇回流提取 6 h，提取物用正丁醇萃取 3 次，每次 300 mL，正丁醇层用 1% NaOH 萃取 3 次，每次 300 mL，碱水层用 0.1% 稀盐酸调 pH 至 4，再用正丁醇反相萃取，浓缩蒸干正丁醇层，即得）。乙腈为色谱纯（北京百灵威科技有限公司）；冰醋酸、甲醇为色谱纯（天津基准化学试剂有限公司）。

1.2 仪器 AUX120 型分析天平（岛津香港有限公司）；KQ-200KDB 型高功率数控超声波清洗器（昆山市超声仪器有限公司）；JJW-5KVA 型精密净化交流稳压电源（广东易事特电源股份有限公司）；Lab Alliance series III 型分析泵；Spectra System UV6000LP 二极管阵列检测器；EZ Chrome 工作站；安捷伦 1200 型高效液相色谱仪（美国安捷伦公司），配置二元梯度泵、紫外检测器、柱温箱、自动进样器；离子阱质谱仪（德国布鲁克公司），配置电喷雾离子源、HP Laser Jet P3015、HP xw4600 Work station 工作站。

2 方法与结果

2.1 HPLC 指纹图谱

2.1.1 色谱条件 Agilent TC-C₁₈ 色谱柱（4.6 mm × 250 mm，5 μm）；流动相乙腈-0.1% 醋酸，梯度洗脱（0 min，10% 乙腈；10 ~ 60 min，20% ~ 24% 乙腈）；体积流量 1 mL/min；柱温 30 ℃；检测波长 280 nm；进样量 20 μL。

2.1.2 对照品溶液制备 精密称取斯皮诺素对照品 10.0 mg，置于 10 mL 量瓶中，甲醇定容，摇匀，制成 1 mg/mL 对照品溶液，0.45 μm 微孔滤膜过滤，备用。

2.1.3 供试品溶液制备 精密称取酸枣仁黄酮 10.0 mg，置于 10 mL 量瓶中，甲醇超声振荡溶解，冷却至室温，甲醇稀释定容，摇匀，得到 1 mg/mL 供试品溶液，0.45 μm 微孔滤膜过滤，备用。

2.1.4 精密度试验 取供试品溶液连续进样 6 次，测得共有峰相对保留时间 RSD 均小于 4.47%，表明仪器精密度良好。

2.1.5 重复性试验 取同一批样品，按“2.1.3”项下方法平行制备供试品溶液 6 份，进样分析，以 5 号峰（斯皮诺素）为参照峰，测得各峰相对保留时间 RSD 均小于 4.86%，表明该方法重复性良好。

2.1.6 稳定性试验 取同一批供试品溶液于 0、4、8、12、24 h 进样测定，以 5 号峰（斯皮诺素）为参照峰，测得各峰相对保留时间 RSD 均小于 4.68%，表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.1.7 指纹图谱建立 精密称取 10 批供试品溶液（S1 ~ S10）各 20 μL，在“2.1.1”项色谱条件下测定，将实验数据导入中药色谱指纹图谱相似度评价软件（2004 年 A 版），生成标准图谱，确定了 10 个共有峰（图 1），相似度均在 0.98 以上。

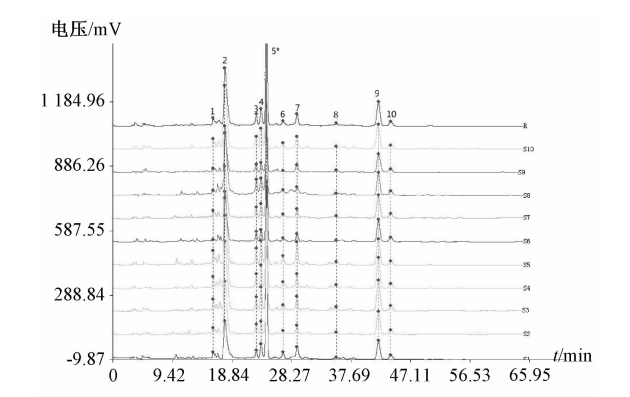


图 1 黄酮 HPLC 指纹图谱
Fig. 1 HPLC fingerprints of flavonoids

2.1.8 指纹图谱评价 将对照品图谱与样品图谱进行比较，确定 5 号峰为斯皮诺素，并将其设定为参照峰。同时测定 10 批样品，根据保留时间标定 10 个共有峰，而且非共有峰面积小于 5%，表明指纹图谱各项指标均符合《中药注射剂指纹图谱研究的技术要求（暂行）》^[6]的要求。

2.1.9 共有峰指认 结果见表 1^[7-9]。

表 1 共有峰鉴定结果
Tab. 1 Results of common peak identification

峰号	t_R/min	分子式	实验值 m/z	理论值 m/z	MS/MS 碎片	成分名
			$[M+H]^+$	$[M+H]^+$		
1	16.72	$C_{27}H_{30}O_{15}$	595.2	595.16	592.2, 577.1, 541.1, 457.1, 379.0, 337.0, 325.0	维采宁-II
3	23.09	$C_{27}H_{30}O_{15}$	595.1	594.52	595.1, 432.3, 366.4, 312.4, 532.1	牡荆素葡萄糖苷
4	23.78	$C_{28}H_{32}O_{15}$	609.1	608.54	609.1, 447.1, 411.1, 393.1, 327.1, 297.1, 285.1	异斯皮诺素
5	24.47	$C_{28}H_{32}O_{15}$	609.1	608.54	609.1, 326.5, 428.5, 380.4, 488.4, 590.5	斯皮诺素
6	27.47	$C_{34}H_{35}NO_{16}$	714.3	714.20	714.3, 594.2, 576.1, 429.1, 393.0, 351.0, 327.1	6''-pyridyloylspinosin
7	29.70	$C_{35}H_{36}O_{17}$	729.1	729.20	729.1, 711.2, 609.2, 447.1, 429.1, 411.1, 381.1, 351.1, 327.1, 297.1, 285.1, 121.1	6''-对羟基苯甲酰斯皮诺素
9	42.29	$C_{38}H_{40}O_{18}$	785.2	784.71	784.71, 296.3, 380.5, 502.0, 664.6, 326.5, 428.4, 604.0, 766.7	6''-阿魏酰斯皮诺素
10	44.37	$C_{37}H_{18}O_{17}$	755.2	755.2	755.2, 635.2, 489.1, 429.1, 411.1, 381.1, 351.1, 327.1, 297.1, 147.1	6''-对香豆酰斯皮诺素

2.2 含有量测定

2.2.1 色谱条件 Agilent TC-C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相乙腈-0.1% 醋酸, 梯度洗脱 (0 min, 10% 乙腈; 5 min, 20% 乙腈; 5 ~ 40 min, 20% ~ 30% 乙腈); 体积流量 1 mL/min; 柱温 30 ℃; 检测波长 280 nm; 进样量 20 μL。在此条件下, 各色谱峰分离良好, 色谱图见图 2。

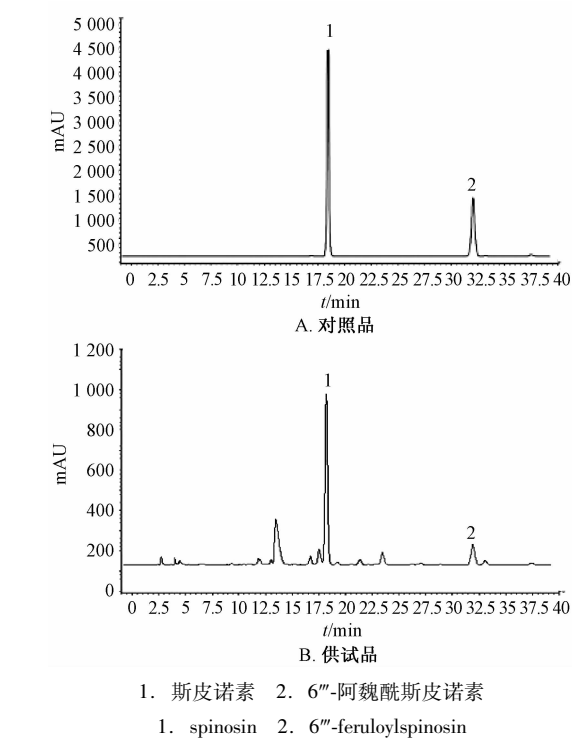


图 2 2 种成分 HPLC 色谱图

Fig. 2 HPLC chromatograms of two constituents

2.2.2 酸枣仁黄酮制备 将干燥粉碎后的酸枣仁用 3 倍量石油醚在 70 ℃ 下回流脱脂 3 次, 每次 2、1、1 h, 再以 6、6、4 倍量 70% 乙醇在 95 ℃ 下回流提取 3 次, 每次 3、2、1 h, 合并提取液, 减压

蒸馏, 浓缩至无醇味。蒸馏水混悬后正丁醇萃取 3 次, 合并正丁醇层, 减压浓缩, 1% NaOH 溶液萃取 2 次, 收集下层, 0.1% 稀盐酸调节 pH 至 4, 正丁醇萃取 3 次, 减压浓缩溶剂, 干燥, 即得。

2.2.3 溶液制备

2.2.3.1 对照品溶液 精密称取斯皮诺素和 6''-阿魏酰斯皮诺素对照品适量, 加甲醇分别制成含两者 0.3 mg/mL 和 0.1 mg/mL 的对照品溶液。

2.2.3.2 供试品溶液 精密称取样品 10 mg, 置于 100 mL 量瓶中, 加甲醇定容至刻度, 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 取过滤液, 即得。

2.2.4 方法学考察

2.2.4.1 线性关系考察 精密吸取 “2.2.3.1” 项下所得对照品溶液 0.5、0.83、1.00、1.17、1.33 mL, 置于 10 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 配制成不同质量浓度, 吸取 20 μL 注入色谱仪中, 记录峰面积。以对照品进样量为横坐标 (X), 峰面积为纵坐标 (Y) 进行回归, 得回归方程分别为斯皮诺素 $Y = 191\,054X - 772.7$ ($r = 0.999\,7$), 线性范围 15.00 ~ 40.00 μg; 6''-阿魏酰斯皮诺素 $Y = 141\,767X - 17\,300$ ($r = 0.999\,7$), 线性范围 5.00 ~ 14.00 μg。

2.2.4.2 精密度试验 精密吸取混合对照品溶液 20 μL, 在 “2.2.1” 项色谱条件下连续进样 6 次, 测得斯皮诺素和 6''-阿魏酰斯皮诺素峰面积 RSD 分别为 1.26% 和 0.49%, 表明仪器精密度良好。

2.2.4.3 重复性试验 精密称取同批样品 6 份, 按 “2.2.3.2” 项下方法平行制备供试品溶液, 在 “2.2.1” 项色谱条件下测定, 测得斯皮诺素和 6''-阿魏酰斯皮诺素峰面积 RSD 分别为 1.38% 和 0.63%, 表明该方法重复性良好。

2.2.4.4 稳定性试验 精密吸取同批供试品溶液，在“2.2.1”项色谱条件下于 0、2.5、5、7.5、10、24 h 精密吸取 20 μL 测定，测得斯皮诺素和 6'''-阿魏酰斯皮诺素峰面积 RSD 分别为 1.92% 和 0.93%，表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.2.4.5 加样回收率试验 精密称取同一批次（批号 20150407）样品 9 份，按“2.2.3.2”项下方法平行制备供试品溶液，按相当于样品溶液中斯皮诺素和 6'''-阿魏酰斯皮诺素含有量的 80%、100%、120% 加入对照品溶液，在“2.2.1”项色谱条件下测定。结果见表 2。

表 2 2 种成分加样回收率试验结果 (n=9)

Tab. 2 Results of recovery tests for two constituents(n=9)

成分	称样量/ g	原有量/ mg	加入量/ mg	测得量/ mg	回收率/ %	平均回收 率/% (RSD/%)
斯皮诺素	0.010 1	1.669	1.653	3.352	101.8	100.5 (1.6)
	0.010 2	1.669	1.653	3.368	100.3	
	0.010 1	1.669	1.653	3.370	100.3	
	0.010 3	1.702	1.322	3.046	101.7	
	0.010 1	1.669	1.322	3.021	102.3	
	0.010 4	1.702	1.322	2.989	97.35	
	0.010 2	1.669	1.984	3.624	98.54	
	0.010 1	1.669	1.984	3.578	101.26	
	0.010 3	1.702	1.984	3.709	101.16	
	0.010 1	0.571	0.565	1.131	99.16	
6'''-阿魏 酰斯皮 诺素	0.010 2	0.576	0.565	1.132	98.40	100.4 (1.6)
	0.010 1	0.571	0.565	1.132	99.29	
	0.010 3	0.582	0.678	1.257	99.56	
	0.010 2	0.571	0.678	1.264	102.2	
	0.010 4	0.588	0.678	1.261	99.26	
	0.010 2	0.576	0.452	1.036	101.8	
	0.010 1	0.571	0.452	1.034	102.4	
	0.010 3	0.582	0.452	1.044	102.2	

2.2.4.6 样品含有量测定 取 3 批样品，按“2.2.3.2”项下方法制备供试品溶液，在“2.2.1”项色谱条件下测定，结果见表 3。

表 3 2 种成分含有量测定结果 (mg/g, n=3)

Tab. 3 Results of content detrmination of two constituents (mg/g, n=3)

批号	斯皮诺素	6'''-阿魏酰斯皮诺素
20150407	165.31	56.79
20150525	165.27	56.41
20150616	161.53	52.71

3 讨论

本实验前期比较了乙腈-水 (0.1% 醋酸)^[10]、乙腈-水^[11]、乙腈-0.05% 磷酸^[12] 流动相体系，最终确定“2.1.1”项下条件，此时斯皮诺素和 6'''-

阿魏酰斯皮诺素能够完全分离，并且不与其他色谱峰发生重叠。同时，测定了两者含有量，能定量反映酸枣仁黄酮的药效，也有助于节约实验成本，简化操作步骤。

根据 HPLC 指纹图谱的定性特征和两种成分的定量信息，初步确定酸枣仁黄酮的质量控制标准为指纹图谱中含有 10 个共有峰，与标准图谱的相似度大于 0.980，斯皮诺素含有量高于 161.53 mg/g，6'''-阿魏酰斯皮诺素含有量高于 52.71 mg/g，可为该类成分制备的标准化和规范化提供科学依据。

参考文献:

[1] 《中国药物大全》编辑委员会. 中国药物大全: 中药卷 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1991: 277.

[2] 吴玉兰, 许惠琴, 陈 洗. 酸枣仁不同炮制品及炒酸枣仁中总黄酮与总皂苷的镇静催眠作用比较[J]. 时珍国医国药, 2005, 16(9): 868-869.

[3] Bao K D, Li P, Li H J. Simultaneous determination of flavonoids and saponins in *Semen Ziziphi Spinosae* (Suanzaoren) by high performance liquid chromatography with evaporative light scattering detection[J]. *Chin J Nat Med*, 2009, 7(1): 47-53.

[4] Sun S, Liu H, Xu S, *et al.* Quality analysis of commercial samples of *Ziziphi spinosae Semen* (suanzaoren) by means of chromatographic fingerprinting assisted by principal component analysis[J]. *J Pharm Sci*, 2014, 4(3): 217-222.

[5] 刘昌孝, 陈士林, 肖小河, 等. 中药质量标志物 (Q-Marker): 中药产品质量控制的新概念[J]. 中草药, 2016, 47(9): 1443-1457.

[6] 国家药品监督管理局. 中药注射剂指纹图谱研究的技术要求 (暂行) [J]. 中成药, 2000, 22(10): 671-675.

[7] 王卫记, 罗建光, 孔令义. HPLC-ESI-MSⁿ 分析酸枣仁有效部位的化学成分[J]. 中国中药杂志, 2009, 34(21): 2768-2773.

[8] 朱云祥, 陈璐琳, 龚婧如, 等. LC-Q-TOF-MS 及 LC-IT-MS 分析酸枣仁汤的化学成分[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(3): 457-465.

[9] Zhang F X, Li M, Qiao L R, *et al.* Rapid characterization of *Ziziphi Spinosae Semen* by UPLC/Q^t of MS with novel informatics platform and its application in evaluation of two seeds from *Ziziphus* species [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2016, 122: 59-80.

[10] 解军波, 刘 艳, 张彦青, 等. HPLC 法测定酸枣仁黄酮片中斯皮诺素[J]. 中草药, 2010, 41(10): 1653-1655.

[11] 李 游, 梁宗锁, 周白云, 等. 基于 HPLC 指纹图谱和定量分析法评价酸枣仁质量[J]. 食品科学, 2010, 31(4): 143-149.

[12] 崔思娇, 罗 洁, 马天成, 等. 酸枣仁的超高效液相色谱指纹图谱[J]. 中国药学杂志, 2013, 48(7): 509-511.