

酸枣仁醇提取物中4个活性成分的测定

张翠英, 刘 峰, 郭丽丽, 张秋燕, 程慧平, 王 阶*
(中国中医科学院广安门医院, 北京 100053)

摘要:目的 建立 HPLC-ELSD 法同时检测酸枣仁醇提取物中4个活性成分的方法。方法 色谱柱为 Agilent TC-C₁₈ BDS (250 mm×4.6 mm 5 μm) 流动相为乙腈-水梯度洗脱,体积流量为1.0 mL/min,ELSD 漂移管温度为110.5 °C,气体流量为3.1 mL/min。结果 4个活性成分斯皮诺素、酸枣仁皂苷 A、酸枣仁皂苷 B 和白桦脂酸均达到基线分离,其进样量分别在0.110~1.10、0.042~2.12、0.020~1.01、0.078~7.84 μg 范围内与峰面积分值呈良好线性关系,平均回收率分别为99.98%、97.80%、97.24%、95.04% (RSD≤4.3%)。结论 本法灵敏度高、重现性好,可用于酸枣仁醇提取物的质量控制。

关键词:酸枣仁醇提取物; HPLC-ELSD; 酸枣仁皂苷 A; 酸枣仁皂苷 B; 白桦脂酸; 斯皮诺素

中图分类号: R284.1

文献标志码: A

文章编号: 1001-4528(2011)12-2119-03

Simultaneous determination of four active ingredients in ethanolic extracts of *Ziziphi spinosae Semen* by HPLC-ELSD

ZHANG Cui-ying, LIU Feng, GUO Li-li, ZHANG Qiu-yan, CHENG Hui-ping, WANG Jie*
(Guang'anmen Hospital, China Academy of Chinese Medical Science, Beijing 100053, China)

KEY WORDS: ethanolic extracts of *Ziziphi spinosae Semen*; HPLC-ELSD; jujuboside A; jujuboside B; spinosin; betulinic acid

酸枣仁为鼠李科植物酸枣 *Ziziphus jujuba* Mill. var. *spinosa* (Bunge) Hu ex H. F. Chou 的干燥成熟种子^[1],其味酸性平,补肝、宁心、敛汗、生津,主要用于治疗虚烦不眠、惊悸多梦、体虚多汗、津伤口渴等症,为中医首选安神药。酸枣仁中含有丰富的三萜类成分,其中酸枣仁皂苷 A、B 是其镇静催眠的主要皂苷类有效成分^[2-4],白桦脂酸具有较好的抗肿瘤活性^[5-6],同时实验证明黄酮类成分斯皮诺素能延长戊巴比妥诱导的睡眠时间、减少浅睡眠^[7]。酸枣仁醇提取物作为镇静催眠活性部位^[8],鲜有同时检测其有效活性成分三萜类和黄酮类成分的报道。本研究采用 HPLC-ELSD 法同时测定酸枣仁醇提取物中酸枣仁皂苷 A、B 以及白桦脂酸、斯皮诺素,以控制酸枣仁提取物的质量,保证酸枣仁提取物相关制剂的临床疗效。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 Agilent 1200 型高效液相色谱仪(美国安捷伦公司),配置 G1332A Degasser 在线脱气机, G1311A Quat Pump 四元梯度泵, G1329A ALS 自动进样器、ELSD 2000ES(美国奥泰科技有限公司); KQ-500DE 超声提取器(昆山市超声仪器有限公司); METTLER AB135-S 电子天平(瑞士)。

1.2 试剂 酸枣仁皂苷 A(批号:110734-200509)、酸枣仁皂苷 B(批号:110814-200607)、斯皮诺素(111869-201001)均购于中国药品生物制品检定所;白桦脂酸(批号:09120822)购于上海同田生物技术有限公司;10批酸枣仁购自北京丰泰金源药业有限公司(产地均为河北),经中国中医科学院广安门医院张翠英副研究员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,研究用10批酸枣仁提取物为本研究室自制;乙腈为色谱纯,水为重蒸馏水,其它试剂

收稿日期:2011-06-13

基金项目:国家重大新药创制科技重大专项(2009ZX09103-355)

作者简介:张翠英(1972—)女,博士,副研究员,研究方向:中药药效成分的研究。E-mail: zhangcui727@yahoo.com.cn

* 通信作者:王 阶,男,博士,主任医师,博士生导师。E-mail: wangjie0103@yahoo.com.cn

均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱: Agilent TC-C₁₈ BDS(250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱。流动相为乙腈(A)-水(B) 梯度洗脱: 0~10 min, 10%→19% A; 20 min, 23% A; 30 min, 35% A; 35 min, 50% A; 40 min, 70%; 43.5 min, 90% A; 53.4 min, 100% A, 均为线性洗脱。体积流量: 1.0 mL/min。柱温: 30 ℃。ELSD 漂移管温度: 110.5 ℃。气体流量: 3.1 mL/min。碰撞阀关闭。

2.2 混合对照品贮备液的制备 精密称取斯皮诺素、酸枣仁皂苷 A、酸枣仁皂苷 B、白桦脂酸适量, 加甲醇溶解, 配制对照品混合贮备液(斯皮诺素、酸

枣仁皂苷 A、酸枣仁皂苷 B、白桦脂酸质量浓度分别为 1.10、2.12、1.01、7.84 mg/mL) 备用。

2.3 供试品溶液的制备 精密称取不同批次酸枣仁提取物 0.4 g 至具塞锥形瓶中, 加入甲醇 20 mL, 超声处理 15 min, 过滤并转移至 25 mL 量瓶中, 用甲醇 5 mL 洗涤残渣, 加甲醇稀释至刻度, 作为供试品溶液。

2.4 系统适用性试验 精密吸取混合对照品溶液、供试品溶液, 注入 HPLC 色谱仪, 记录色谱图, 在选定的色谱条件下斯皮诺素、酸枣仁皂苷 A、酸枣仁皂苷 B 和白桦脂酸的理论塔板数均不少于 10 000, 与其他峰的分度均大于 1.5, 见图 1。

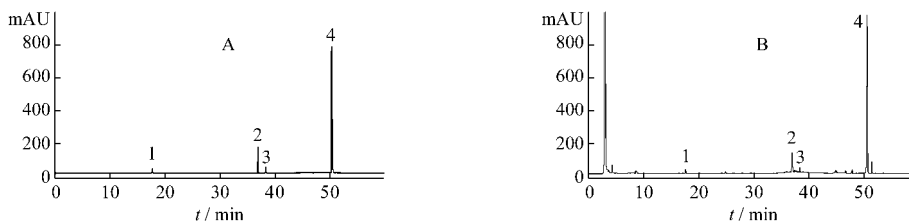


图 1 混合对照品(A)和样品(B) HPLC 谱图

Fig 1 HPLC chromatograms of mixed standard compounds (A) and *Ziziphi spinosae Semen* sample (B)

1. 斯皮诺素 2. 酸枣仁皂苷 A 3. 酸枣仁皂苷 B 4. 白桦脂酸
1. spinosin 2. jujuboside A 3. jujuboside B 4. betulinic acid

2.5 4种活性成分的检测

2.5.1 线性关系的考察 将对照品混合贮备液稀释至系列浓度的溶液: 斯皮诺素质量浓度分别为 0.011 0、0.013 7、0.027 4、0.054 8、0.110 mg/mL; 酸枣仁皂苷 A 质量浓度分别为 0.004 24、0.005 3、0.008 48、0.021 2、0.212 mg/mL; 酸枣仁皂苷 B 质量浓度分别为 0.002 02、0.002 53、0.004 04、0.010 1、0.101 mg/mL; 白桦脂酸质量浓度分别为 0.007 84、0.015 7、0.031 4、0.078 4、0.784 mg/mL, 摇匀 0.45 μm 滤膜滤过, 弃去初滤液, 取续滤液, 进样 10 μL 测定。以进样质量的自然对数值为横坐标, 峰面积的自然对数值为纵坐标, 计算回归方程, 相应的回归方程、相关系数和线性范围分别为斯皮诺素 $Y = 1.11X + 0.326$ ($r = 0.999 6$), 线性范围为 0.110 ~ 1.10 μg; 酸枣仁皂苷 A $Y = 1.48X - 0.130$ ($r = 0.999 6$), 线性范围为 0.042 ~ 2.12 μg; 酸枣仁皂苷 B $Y = 1.17X + 0.291$ ($r = 0.999 8$), 线性范围为 0.020 ~ 1.01 μg; 白桦脂酸 $Y = 1.30X + 0.354$ ($r = 0.999 5$), 线性范围为 0.078 ~ 7.84 μg。

2.5.2 精密度试验 精密吸取同一供试品溶液(3号提取物)连续进样 5 次, 记录色谱峰面积, 结果斯

皮诺素、酸枣仁皂苷 A、酸枣仁皂苷 B 和白桦脂酸峰面积的 RSD 值分别为 2.3%、2.0%、3.9%、3.6%。结果表明, 仪器精密度较好。

2.5.3 稳定性试验 精密吸取同一供试品溶液(3号提取物)在 0、2、4、8、10、12 h 分别进样分析, 记录色谱峰面积, 结果斯皮诺素、酸枣仁皂苷 A、酸枣仁皂苷 B 和白桦脂酸峰面积的 RSD 值分别为 3.7%、3.7%、3.4%、3.1%。结果表明, 供试品在本实验条件下稳定性良好。

2.5.4 重复性试验 取酸枣仁提取物(3号提取物)5份, 每份约 0.4 g, 按 2.3 项方法制备, 并进样分析, 记录色谱峰面积, 结果斯皮诺素、酸枣仁皂苷 A、酸枣仁皂苷 B 和白桦脂酸峰面积的 RSD 值分别为 3.9%、4.5%、4.2%、2.8%。结果表明, 本方法重复性较好。

2.5.5 加样回收率试验 取酸枣仁提取物(3号提取物)0.2 g 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 分别精密加入斯皮诺素(0.45 mg/mL)、酸枣仁皂苷 A(0.80 mg/mL)、酸枣仁皂苷 B(0.25 mg/mL)、白桦脂酸(3.69 mg/mL)的混合溶液 1 mL, 按 2.3 项下方法制备加样供试品溶液并进样分析, 结果斯皮诺素、酸

枣仁皂苷 A、酸枣仁皂苷 B 和白桦脂酸的平均回收率分别为 100.0%、97.8%、97.2%、97.6%，其相应的 RSD 分别为 2.7%、3.0%、2.3%、3.3%。

表 1 斯皮诺素的加样回收率试验结果

Tab. 1 The recovery test result of spinosin in

Ziziphi spinosae Semen

原有量 /mg	加入量 /mg	实测量 /mg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD /%
0.459 6	0.45	0.898 3	97.5		
0.451 5	0.45	0.903 3	100.4		
0.466 5	0.45	0.918 8	100.5	100.0	2.7
0.456 0	0.45	0.889 3	96.3		
0.456 0	0.45	0.921 2	103.4		
0.500 7	0.45	0.960 2	102.1		

表 2 酸枣仁皂苷 A 的加样回收率试验结果

Tab. 2 The recovery test result of jujuboside A in

Ziziphi spinosae Semen

原有量 /mg	加入量 /mg	实测量 /mg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD /%
0.718 7	0.80	1.491 5	96.6		
0.706 2	0.80	1.528 0	102.7		
0.729 6	0.80	1.495 0	95.7	97.8	3.0
0.713 2	0.80	1.516 0	100.4		
0.713 2	0.80	1.481 5	96.0		
0.783 1	0.80	1.546 0	95.4		

表 3 酸枣仁皂苷 B 的加样回收率试验结果

Tab. 3 The recovery test result of jujuboside B in

Ziziphi spinosae Semen

原有量 /mg	加入量 /mg	实测量 /mg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD /%
0.294 0	0.16	0.450 7	97.9		
0.288 9	0.16	0.451 2	101.4		
0.298 5	0.16	0.452 7	96.4	97.2	2.3
0.291 8	0.16	0.445 0	95.8		
0.291 8	0.16	0.445 2	95.9		
0.320 4	0.16	0.473 2	95.5		

表 4 白桦脂酸的加样回收率试验结果

Tab. 4 The recovery test result of betulinic acid in

Ziziphi spinosae Semen

原有量 /mg	加入量 /mg	实测量 /mg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD /%
3.680 8	3.69	7.509 5	103.8		
3.616 6	3.69	7.136 8	95.4		
3.736 4	3.69	7.260 0	95.5	97.6	3.3
3.652 3	3.69	7.242 5	97.3		
3.652 3	3.69	7.278 8	98.3		
4.010 3	3.69	7.521 3	95.1		

2.5.6 测定 分别取不同批次酸枣仁提取物,按 2.3 项下方法制备供试品溶液并进样分析,以外标

两点法计算酸枣仁提取物中斯皮诺素、酸枣仁皂苷 A、酸枣仁皂苷 B 和白桦脂酸,测定结果见表 5。

表 5 10 批酸枣仁提取物中 4 种成分的测定结果

Tab. 5 The contents of four active ingredients in ethanolic extracts of *Ziziphi spinosae Semen*

批次	斯皮诺素 / (mg/g)	酸枣仁皂苷 A / (mg/g)	酸枣仁皂苷 B / (mg/g)	白桦脂酸 / (mg/g)
1	2.12	3.31	1.80	18.9
2	2.64	3.49	2.14	21.8
3	2.11	3.30	1.35	16.9
4	1.80	3.96	1.10	20.3
5	1.86	3.90	1.27	15.4
6	2.50	3.81	1.25	17.0
7	2.10	3.36	0.930	17.9
8	2.12	3.82	1.17	20.7
9	3.00	4.97	0.977	18.3
10	2.65	3.94	1.37	20.3

3 讨论

3.1 提取方法的考察 采用甲醇、70% 甲醇和 50% 甲醇作为提取溶剂,以冷浸、回流和超声提取为提取方法,对提取时间以及溶剂量考察同一酸枣仁提取物样品的提取效果。结果表明:甲醇作为提取溶剂、超声提取 15 min、25 mL 甲醇的提取效率最高,谱图中的色谱峰特征性较强,分离度高。

3.2 色谱条件的优化 《中国药典》2010 年版一部收载的酸枣仁药材分别对酸枣仁皂苷 A 和斯皮诺素建立了测定方法,本试验依据该方法以及其他文献报道^[9-10],对流动相组成及洗脱梯度进行了摸索、考察。流动相组成主要考察了甲醇-水、乙腈-水两个洗脱系统,试验结果表明,乙腈的洗脱能力强于甲醇,利于成分极性差别较大的洗脱,所以选择乙腈-水作为流动相比较理想,峰形比较对称;流动相中加入有机酸(0.1% 甲酸或 1% 醋酸)以利于减少拖尾、改善峰形,但效果并不理想,所以最后确定乙腈-水作为流动相。

由于高效液相色谱法常用的紫外(UV)检测器不利于皂苷类成分的检测,为了达到一个色谱条件同时检测三萜类(包括皂苷)、黄酮类成分的目的,本实验选用蒸发光散射(ELSD)检测器进行检测。试验过程中,对 ELSD 的漂移管温度、载气流速进行了比较优化,确定检测器的漂移管温度为 110.5 °C,载气流量为 2.9 L/min。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2010 年版一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 343-344.

[饮片炮制]

甘遂不同炮制品中二萜类成分的变化研究

李征军, 李 媛, 高 兰, 丁安伟, 张 丽*

(南京中医药大学 江苏省方剂研究重点实验室, 江苏 南京 210046)

摘要:目的 比较甘遂炮制前后各炮制品中二萜类成分甘遂萜酯 B 和甘遂萜酯 A 含有量的变化, 以期揭示上述成分与甘遂醋炙减毒作用的关联性。方法 采用 HPLC 法测定甘遂各炮制品中二萜类成分甘遂萜酯 A、甘遂萜酯 B, 以 X Terre RP C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 150 mm, 5 μm) 为固定相; 流动相为甲醇 (A) -水 (B) 二元梯度洗脱, 体积流量 1.0 mL/min, 检测波长 235 nm, 柱温 38 °C。结果 假白榄烷型二萜类成分甘遂萜酯 A 和甘遂萜酯 B 经炮制后均有所降低, 其质量分数高低顺序为生品 > 清炒品 > 醋润品 > 醋炙品。结论 甘遂醋炙前后甘遂萜酯 A 与甘遂萜酯 B 的含有量变化与甘遂醋炙减毒有一定的关联性。

关键词: 甘遂萜酯 B; 甘遂萜酯 A; 二萜; 甘遂; 醋甘遂

中图分类号: R283

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2011)12-2122-04

Change of diterpenoids in different processed products of *Euphorbia kansui*

LI Zheng-jun, LI Yuan, GAO Lan, DING An-wei, ZHANG Li*

(Nanjing University of Chinese Medicine, Jiangsu Provincial Key Laboratory for Traditional Chinese Medicine Formulae Research, Nanjing 210046, China)

ABSTRACT: AIM To compare the contents change of kansuine B and kansuine A in *Kansui Radix* before and after being processed with vinegar, and to reveal the correlation between the composition and detoxication of *Kansui Radix* stir-frying with vinegar. **METHODS** HPLC was used to detect the contents of kansuine B and kansuine A with X Terre RP C₁₈ column (4.6 mm × 150 mm, 5 μm). The mobile phase was gradient eluant of methanol and H₂O with the flow rate 1.0 mL/min, and the detection wavelength was set at 235 nm and with column temperature of 38 °C. **RESULTS** The contents of kansuine A and kansuine B decreased after being pro-

收稿日期: 2011-06-03

基金项目: 国家自然科学基金项目(30973940); 江苏政府留学奖学金资助(JS-2009-061); 江苏高校优势学科建设工程资助项目(YSXK-2010)

作者简介: 李征军, 硕士生, 研究方向: 中药炮制。Tel: 15250980738, E-mail: lizhengjun404@126.com

* 通信作者: 张 丽(1971—), 教授, 硕士生导师, 研究方向: 中药炮制与质量控制。Tel: (025) 85811519, E-mail: zhangli@njutcm.edu.cn

- [2] Cao J X, Zhang Q Y, Cui S Y, et al. Hypnotic effect of jujubosides from *Ziziphi spinosae Semen* [J]. *J Ethnopharmacol*, 2010, 130(1): 163-166.
- [3] You Z L, Xia Q, Liang F R, et al. Effects on the expression of GABAA receptor subunits by jujuboside A treatment in rat hippocampal neurons [J]. *J Ethnopharmacol*, 2010, 128(2): 419-423.
- [4] 陈百泉, 杜钢军, 许启泰. 酸枣仁皂苷的镇静催眠作用 [J]. *中草药*, 2002, 25(6): 429-430.
- [5] Yogeewari P, Stritam D. Betulinic acid and its derivatives: a review on their biological properties [J]. *Curr Med Chem*, 2005, 12(6): 657-666.
- [6] 陈 子, 吴秋玲, 陈 燕, 等. 白桦脂酸对人 Raji 淋巴瘤细胞增殖、凋亡及细胞周期的影响 [J]. *中草药*, 2008, 39(4): 556-559.
- [7] Wang L E, Cui X Y, Cui S Y, et al. Potentiating effect of spinosin, a C-glycoside flavonoid of *Ziziphi spinosae Semen*, on pentobarbital-induced sleep may be related to postsynaptic 5-HT_{1A} receptors [J]. *Phytomedicine*, 2010, 17(6): 404-409.
- [8] Peng W H, Hsieh M T, Lee Y S, et al. Anxiolytic effect of seed of *Ziziphus jujuba* in mouse models of anxiety [J]. *J Ethnopharmacol*, 2000, 72(3): 435-441.
- [9] Zeng W Z, Bai Y J, Zhang Q Y, et al. Chromatographic fingerprint analysis of *Ziziphi spinosae Semen* by HPLC-DAD Method [J]. *Anal Lett*, 2009, 42(2): 205-215.
- [10] Zhao J, Li S P, Yang F Q, et al. Simultaneous determination of saponins and fatty acids in *Ziziphus jujuba* (Suanzaoren) by high performance liquid chromatography-evaporative light scattering detection and pressurized liquid extraction [J]. *J Chromatogr A*, 2006, 1108(2): 188-194.