

HPLC-DAD-ELSD法同时测定酸枣仁中斯皮诺素、酸枣仁皂苷 A 和 B 的含量^{*}

闫艳¹, 杜晨晖¹, 李小菊¹, 王洪兰², 裴香萍^{1*}, 裴妙荣¹

(1. 山西中医学院中药系, 太原 030024 2. 南京中医药大学, 南京 210046)

摘要 目的: 建立同时测定酸枣仁中斯皮诺素、酸枣仁皂苷 A 和 B 含量的 HPLC-DAD-ELSD 方法。方法: 采用 Grace Brava C₁₈-BDS(250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 以乙腈(A)-水(B)为流动相进行梯度洗脱, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 二极管阵列检测器的检测波长为 335 nm, 蒸发光散射检测器的漂移管温度为 100 °C, 载气流速为 2.9 L·min⁻¹, 柱温为 25 °C。结果: 斯皮诺素、酸枣仁皂苷 A 和 B 的线性范围分别为 59.40~594.0 μg·mL⁻¹ ($r=0.9996$), 49.50~900.0 μg·mL⁻¹ ($r=0.9998$), 20.36~407.2 μg·mL⁻¹ ($r=0.9999$); 平均加样回收率 ($n=6$) 分别为 96.9% (RSD=1.8%), 101.2% (RSD=2.5%), 100.3% (RSD=2.9%)。结论: 该方法准确、可靠, 在同一色谱条件下实现多指标成分的同时测定, 为酸枣仁的全面质量评价提供参考。

关键词: 酸枣仁; 斯皮诺素; 酸枣仁皂苷 A; 酸枣仁皂苷 B 高效液相色谱法-二极管阵列检测器-蒸发光检测器

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2011)01-0030-04

HPLC-DAD-ELSD simultaneous determination of spinosin, jujuboside A and jujuboside B in Semen Ziziphi Spinosae(Suanzaoren)^{*}

YAN Yan¹, DU Chen-hui¹, LIXiao-ju¹, WANG Hong-lan²,
PEIXiang-ping^{1**}, PEIMiao-rong¹

(1. Department of Traditional Chinese Pharmacy, Shanxi University of Traditional Chinese Medicine, Taiyuan 030024, China 2. Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210046, China)

Abstract Objective To establish an HPLC-DAD-ELSD method for the simultaneous determination of spinosin, jujuboside A and jujuboside B in Semen Ziziphi Spinosae. **Methods** The assay was performed on a Grace Brava C₁₈-BDS(250 mm × 4.6 mm, 5 μm) column by a gradient elution program with acetonitrile-water as mobile phase at a flow rate of 1.0 mL·min⁻¹. The detection wavelength of DAD was 335 nm and the evaporator tube temperature of ELSD was set at 100 °C with the nebulizing gas flow rate of 2.9 L·min⁻¹. The temperature of column was kept at 25 °C. **Results** The linear ranges of spinosin, jujuboside A and jujuboside B were 59.40~594.0 μg·mL⁻¹ ($r=0.9996$), 49.50~900.0 μg·mL⁻¹ ($r=0.9998$), 20.40~407.2 μg·mL⁻¹ ($r=0.9999$), respectively. The average recoveries ($n=6$) were 96.9% (RSD=1.8%), 101.2% (RSD=2.5%), 100.3% (RSD=2.9%), respectively. **Conclusion** The method is accurate and reliable for simultaneous determination of multiple index components under the same chromatographic condition, and provides a reference for comprehensive quality evaluation of Semen Ziziphi Spinosae.

Key words Semen Ziziphi Spinosae; spinosin; jujuboside A; jujuboside B; HPLC-DAD-ELSD

酸枣仁为鼠李科枣属植物酸枣 *Ziziphus jujuba* Mill. var. *spinosa* (Bunge) Hu ex H. F. Chou 的干燥成熟种子, 性平, 味酸, 具有补肝宁心、镇静安神、敛汗、生津的功效, 用于治疗虚烦不眠、惊悸多梦、头晕眼花等症^[1]。酸枣仁的主要化学成分有皂苷类、黄酮

类、生物碱类等。现代药理研究表明酸枣仁中皂苷类和黄酮类化合物是其镇静催眠的主要有效成分^[2]。

酸枣仁主要分布在山西、河北、河南、山东、陕西、辽宁等地。山西是酸枣仁的主产区之一, 目前对

* 山西省卫生厅科技攻关项目 (200939)

** 通讯作者 Tel: (0351) 2272284 E-mail: peixp69@163.com

陕西、河北产酸枣仁的质量分析方法已有文献报道^[3,4],而对山西产酸枣仁的质量分析研究还未见报道。对酸枣仁中皂苷类和黄酮类化合物的定量分析方法多为 HPLC、UV 和 TLC 等,但多针对其中一类成分进行分析^[5~7]。本试验建立 HPLC-DAD-ELSD 法对酸枣仁药材中斯皮诺素、酸枣仁皂苷 A 和 B 含量进行同时测定,建立了山西产酸枣仁的质量分析方法,并与其他产区酸枣仁的质量进行了对比研究。对不同产地酸枣仁药材的质量评价将有助于酸枣仁药材的标准化种植及地道药材的质量控制,同时也为其鉴别提供新的依据。

1 仪器、试剂及样品

Waters 2695 Alliance 系统,包括四元泵、真空在线脱气机、自动进样器、Waters 2998 二极管阵列检测器、Empower 工作站;Alltech 2000ES 蒸发光散射检测器;十万分之一天平(梅特勒公司);EL204 万分之一天平(上海精密仪器有限公司)。

乙腈: Dikma Pure, Dikma Technology NC, 美国;水: 乐百氏纯净水;其他试剂均为分析纯。

对照品: 斯皮诺素(批号 E-0391)购于上海同田生物有限公司,纯度 > 98.0%;酸枣仁皂苷 A(批号 110734-200509)、酸枣仁皂苷 B(批号 110814-200607)均购于中国药品生物制品检定所。

采收山西省 12 个县市和山东、河北、河南、陕西等产地已成熟的酸枣,每个采样点采集酸枣不少于 1 kg。样品经山西中医学院裴香萍讲师鉴定为 *Ziziphus jujuba* Mill var *spinosa* (Bunge) Hu ex H. F. Chou。样品预处理: 对酸枣分别进行处理,除去果肉和角质

层,取酸枣仁药材粉碎,过 40 目筛,60 °C 干燥 8 h 得酸枣仁粉末。

2 溶液制备

2.1 对照品溶液 取对照品适量,精密称定,加入 70% 乙醇分别制备含 1188 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 斯皮诺素、990 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 酸枣仁皂苷 A、1018 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 酸枣仁皂苷 B 的单一对照品储备液。其他不同质量浓度的对照品溶液由 70% 乙醇稀释储备液得到。

2.2 供试品溶液^[8] 取酸枣仁粉末约 1 g 精密称定,置索氏提取器中,加石油醚(60~90 °C) 90 mL,加热回流 4 h 弃去石油醚液,药渣挥去溶剂后转移入圆底烧瓶中,加入 70% 乙醇 40 mL,加热回流提取 3 h 滤过,药渣用 70% 乙醇 5 mL 洗涤,合并洗液和滤液,回收溶剂至干,残渣加 70% 乙醇溶解并转移至 2 mL 量瓶中,加 70% 乙醇至刻度,摇匀,过 0.45 μm 微孔滤膜,取续滤液,即得。

3 色谱条件

采用 Grace Brava C₁₈-BDS(250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱,以乙腈(A)-水(B)为流动相,梯度洗脱^[9](0~10 min 12% A → 19% A; 10~20 min 19% A → 23% A; 20~30 min 23% A → 35% A; 30~40 min 35% A → 45% A; 40~50 min 45% A → 100% A; 50~60 min 100% A → 12% A); 流速^[9] 1.0 mL · min⁻¹; DAD 检测波长^[8]: 335 nm; 柱温 25 °C; 进样量 10 μL ; ELSD 参数: 漂移管温度 100 °C,载气流速 2.9 L · min⁻¹。在上述色谱条件下各色谱峰分离良好,见图 1。

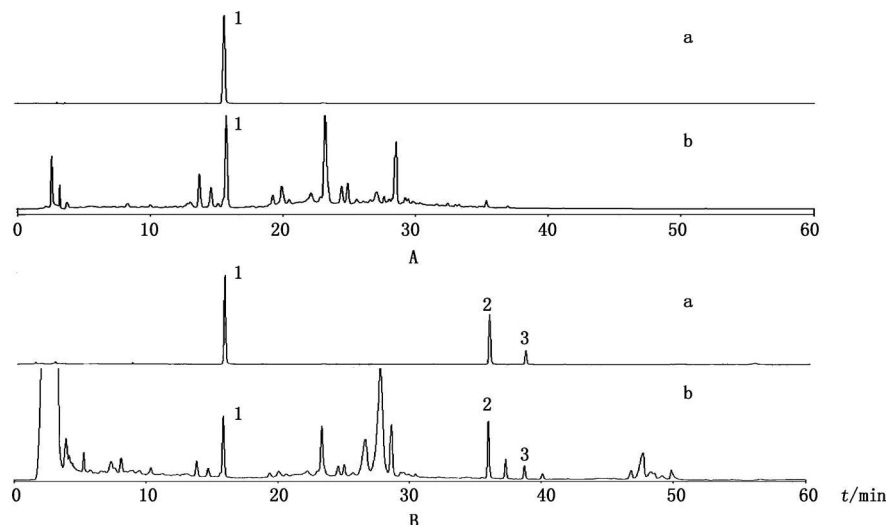


图 1 HPLC-DAD(A)及 HPLC-ELSD(B)色谱图

Fig 1 HPLC-DAD(A) and HPLC-ELSD(B) chromatograms

a 对照品(reference substances) b 11号样品(山西五台)(sample No. 11, Wutai Shanxi)

1 斯皮诺素(spinosin) 2 酸枣仁皂苷 A(jujuboside A) 3 酸枣仁皂苷 B(jujuboside B)

4 方法学考察

4.1 线性关系考察 取上述各对照品储备液, 用 70% 乙醇稀释, 配成斯皮诺素质量浓度分别为 59.40 118.8 237.6 356.4 475.2 594.0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 酸枣仁皂苷 A 质量浓度分别为 49.50 99.00 297.0 396.0 495.0 900.0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 酸枣仁皂苷 B 质量浓度分别为 20.40, 40.70, 122.2 162.9

表 1 斯皮诺素、酸枣仁皂苷 A 和 B 的回归方程、相关系数和线性范围

分析物 (analytes)	回归方程 (regression equation)	<i>r</i>	线性范围 (linear range) / $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$
斯皮诺素 (spinosin)	$A = 2.000 \times 10^7 C + 8.472 \times 10^4$	0.9996	59.40~594.0
酸枣仁皂苷 A (jujuboside A)	$\lg A = 1.498 \lg C + 17.09$	0.9998	49.50~900.0
酸枣仁皂苷 B (jujuboside B)	$\lg B = 1.286 \lg C + 16.37$	0.9999	20.40~407.2

4.2 精密度试验 精密吸取同一对照品混合溶液 (含斯皮诺素、酸枣仁皂苷 A 和 B 浓度分别为 0.0297, 0.02475, 0.01018 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$), 在上述色谱条件下连续进样 6 次, 记录斯皮诺素、酸枣仁皂苷 A 和 B 的峰面积, 计算 RSD 分别为 1.6%, 3.0%, 3.5%。结果表明精密度良好。

4.3 稳定性试验 取山西太谷产酸枣仁粉末约 1 g 精密称定, 按“2.2”项下方法制备供试品溶液, 在室温下放置, 在上述色谱条件下, 分别于 0, 2, 8, 10, 16, 36 h 进样测定。计算斯皮诺素、酸枣仁皂苷 A 和 B 色谱峰面积的 RSD 分别为 1.8%, 2.3%, 2.4%。结果表明, 供试品溶液在 36 h 内稳定。

4.4 重复性试验 取同一批酸枣仁粉末约 1 g 共 6 份, 精密称定, 依“2.2”项下方法制备供试品溶液, 在上述色谱条件下进样测定。斯皮诺素、酸枣仁皂

203.6, 407.2 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的系列对照品混合溶液。分别精密吸取上述对照品混合溶液在上述色谱条件下进行分析。对于斯皮诺素, 以对照品浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标, 绘制标准曲线并进行回归分析; 对于酸枣仁皂苷 A 和 B, 分别取对照品溶液浓度的对数和峰面积的对数为横坐标和纵坐标, 绘制标准曲线并进行回归分析。结果见表 1。

苷 A 和 B 的平均含量分别为 0.845, 0.810, 0.227 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$; RSD 分别为 2.7%, 2.8%, 2.9%。

4.5 加样回收率试验 取“4.4”项下已测知含量的酸枣仁粉末 6 份, 每份约 0.5 g 精密称定, 分别加入对照品混合溶液 (含斯皮诺素、酸枣仁皂苷 A 和 B 分别为 420.0 516.0 112.6 μg) 1 mL, 按“2.2”项下方法制备供试溶液, 在上述色谱条件下进样测定。计算斯皮诺素、酸枣仁皂苷 A 和 B 的平均回收率 ($n=6$) 分别为 96.9% (RSD = 1.8%), 101.2% (RSD = 2.5%), 100.3% (RSD = 2.9%)。

5 样品测定

取不同来源的酸枣仁粉末 1 g 精密称定, 按“2.2”项下方法制备供试品溶液。分别在上述色谱条件下进行分析测定, 外标两点法计算含量。结果见图 2。

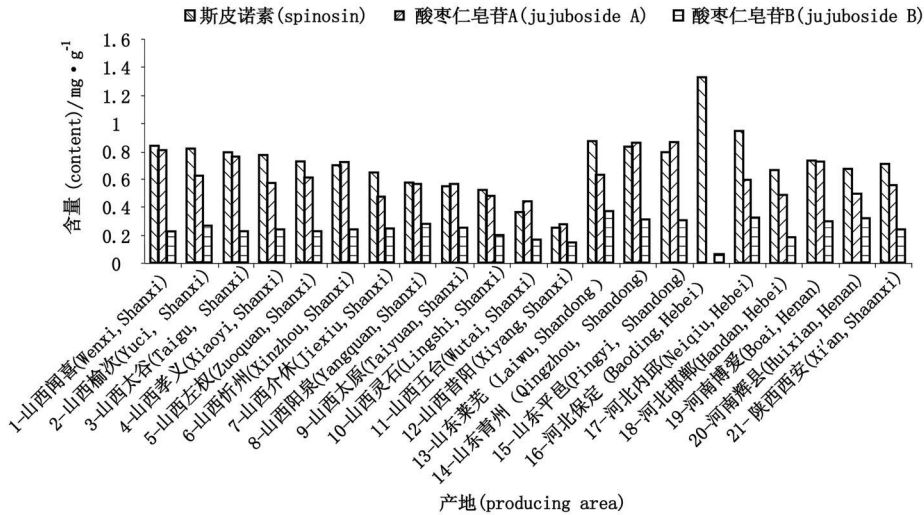


图 2 不同来源酸枣仁 3 种有效成分含量柱状图

Fig 2 The column map of three effective components in Semen Ziziphi Spinosae from different sources

6 讨论

6.1 检测器的选择 斯皮诺素为黄酮类成分, 具有较强的紫外吸收, 其在 DAD 上的响应大于 ELSD, 所以斯皮诺素采用 DAD 的检测结果进行定量分析。而对于相同浓度的酸枣仁皂苷 A 和 B 在 ELSD 上的响应远大于在 DAD 上的响应, 因此, 在本试验中酸枣仁皂苷 A 和酸枣仁皂苷 B 采用 HPLC-ELSD 法测定。

6.2 检测条件的选择 在 ELSD 参数的选择上, 试验在 ELSD 计算软件推荐参数 ($106\text{ }^{\circ}\text{C}$, $2.9\text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$) 的基础上进行了优化, 评价了漂移管温度为 109 、 106 、 100 、 $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 和载气流速为 3.1 、 2.9 、 $2.7\text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ 的响应值, 结果显示最适宜的漂移管温度为 $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。一般来说, 载气流速越低, 响应越强, 但在实验中发现, 当载气流速降至 $2.7\text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ 时基线噪音较大, 故最终还是选择了 $2.9\text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ 。

6.3 样品测定结果分析 从测定结果可以看出, 各产地的酸枣仁中斯皮诺素、酸枣仁皂苷 A 和 B 的含量存在较大的差异。山西 12 个产地的酸枣仁测定结果表明, 以闻喜、榆次、太谷为代表的山西南部 and 山西中部的酸枣仁中 3 种成分含量均较高, 而以五台、昔阳为代表的山西北部 and 山西东部则偏低, 说明酸枣仁的质量受地理、气候等因素的影响较大。从总体上看, 在山西南部 and 山西中部建立酸枣仁 GAP 基地及实现产业化有一定优势。比较山西产与河南、河北、山东等省区产酸枣仁中 3 种活性成分的含量, 结果显示山西产酸枣仁质量较好, 为确定山西产酸枣仁的道地性奠定实验基础。曾以本文方法测定了广西和云南产滇酸枣 (*Ziziphus mauritiana* Lam.), 结果未检测到酸枣仁皂苷 A。

综上所述, 本试验应用 HPLC-DAD-ELSD 法同时检测酸枣仁中的斯皮诺素、酸枣仁皂苷 A 和 B, 不仅能够获得高效、准确的定量结果, 而且可以获得更广泛的物质信息, 可为酸枣仁药材的质量控制提供借鉴。

参考文献

- GU Jian-jun(谷建军). Medicinal examination for the property of wild jujube seed(酸枣仁药性考). *Tradit Chin Med Res* (中医研究), 2005, 18(5): 59
- ZHANG Xue(张雪), DING Chang-he(丁长河), LI He-ping(李和平). Research progress on the chemical compositions and pharmacological effects of *Semen Ziziphi Spinosae*(酸枣仁化学成分和药理作用研究进展). *Sci Technol Food Ind* (食品工业科技), 2009, 3(30): 348
- ZHANG Ya-li(张亚利), LI Xin-gang(李新岗), JIANG Shao-juan(姜少娟), et al Quality comparison of *Ziziphus jujuba* var *spinosa* seed in loess plateau(黄土高原酸枣仁品质比较分析). *J Northwest Forest Univ* (西北林学院学报), 2007, 22(4): 146
- ZHANG Zhi-fei(张志斐), YUAN Zhi-fang(袁志芳), ZHANG Lan-tong(张兰桐), et al HPLC-ELSD fingerprints of genuine *Semen Ziziphi Spinosae* from Hebei province(河北道地药材酸枣仁 HPLC-ELSD 指纹图谱研究). *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2007, 38(8): 1247
- LI Hui-jun(李会军), LI Ping(李萍). Determination of jujuboside A and jujuboside B in spine date seed by HPLC-ELSD(高效液相色谱法蒸发光散射检测器测定酸枣仁中酸枣仁皂苷 A 及 B 的含量). *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 2000, 20(2): 82
- LI Hui-jun(李会军), LI Ping(李萍). Quantitative determination of total flavonoids in *Semen Ziziphi Spinosae* by UV spectrophotometry(紫外分光光度法测定酸枣仁中总黄酮的含量). *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2001, 32(1): 73
- YU Ding-rong(于定荣), YANG Zi-yi(杨梓懿), ZOU Jian-wu(邹建武). Determination of jujuboside A and jujuboside B and the aqueous extract from *Semen Ziziphi Jujubae* processed by different ways(酸枣仁不同炮制品中酸枣仁皂苷 A 和 B 及浸出物含量的测定). *Lishizhen Med Mater Med Res* (时珍国医国药), 2007, 11(3): 2
- ChP(中国药典). 2010. Vol II (一部): 343
- BAO Kang-de(鲍康德), LI Ping(李萍), LI Hui-jun(李会军), et al Simultaneous determination of flavonoids and saponins in *Semen Ziziphi Spinosae*(Suanzaoren) by high performance liquid chromatography with evaporative light scattering detection(HPLC-ELSD 法同时测定酸枣仁中黄酮及皂苷类成分). *Chin J Nat Med* (中国天然药物), 2009, 7(1): 47

(本文于 2010 年 6 月 2 日收到)