

塔里木盆地 17 个引进红枣品种 HPLC 指纹图谱及定量测定的研究

刘 丹¹, 隋月红¹, 陈 朋¹, 沈立荣², 白红进^{1*}

1. 塔里木大学生命科学学院 新疆生产建设兵团塔里木盆地生物资源保护利用重点实验室, 新疆维吾尔自治区 阿拉尔 843300

2. 浙江大学馥莉食品研究院, 浙江 杭州 310058

摘要: **目的** 建立塔里木盆地 17 个引进红枣品种高效液相色谱指纹图谱方法, 为红枣品质的科学评价和产品的质量控制在提供科学依据。**方法** 采用 HPLC 法, 色谱柱 TOSOH TSKgel ODS-100V C₁₈ 柱 (150 mm×4.6 mm, 3 μm), 流动相为甲醇-0.3% 磷酸二氢钾缓冲水溶液, 梯度洗脱, 体积流量 1.0 mL/min, 柱温 40 ℃, 检测波长 260 nm。对采自塔里木大学种质资源圃中 17 个引进品种的红枣进行指纹图谱研究, 用药典委员会颁布的中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004A 进行评价。**结果** 建立了红枣的指纹图谱, 标定了 22 个共有峰, 各峰分离度良好, 并对尿嘧啶、次黄嘌呤、腺嘌呤、胞苷、尿苷、环磷酸腺苷 (cAMP)、环磷酸鸟苷 (cGMP) 进行测定。**结论** HPLC 指纹图谱分析技术可用于红枣的鉴别。

关键词: 红枣; 高效液相色谱; 指纹图谱; 尿嘧啶; 次黄嘌呤; 腺嘌呤; 胞苷; 尿苷; cAMP; cGMP

中图分类号: R286.022 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2015)21-3248-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.21.022

HPLC fingerprint and quantitative determination of 17 introduced *Ziziphus jujube* varieties in Tarim Basin

LIU Dan¹, SUI Yue-hong¹, CHEN Peng¹, SHEN Li-rong², BAI Hong-jin¹

1. Key Laboratory of Protection and Utilization of Biological Resource in Tarim Basin of Xinjiang Production and Construction Corps, College of Life Science, Tarim University, Alar 843300, China

2. Fuli Institute of Food Science, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China

Abstract: Objective To initially establish HPLC fingerprints for analysis of 17 batches of the introduced jujube (*Ziziphus jujuba*) varieties in order to lay the foundation for scientific evaluation and production quality control of jujube. **Methods** TOSOH TSKgel ODS-100V C₁₈ column (150 mm × 4.6 mm, 3 μm) was used. The mobile phase was as follows: methanol and 0.3% KH₂PO₄ in gradient elution mode. The detectable wavelength was 260 nm, the flow rate was 1.0 mL/min, and the separation was performed at 40 ℃. **Similarity Evaluation System for Chromatographic Fingerprint of Chinese Materia Medica 2004A** published by the state Pharmacopoeia Committee of China was adopted for the fingerprint analysis on the 17 batches of introduced jujube varieties in Germplasm Nursery of Tarim University. **Results** The HPLC characteristic fingerprint of jujube has been established. A total of 22 common peaks were characterized, the peaks appeared uniform and were well-separated. The uracil, hypoxanthine, adenine, cytidine, uridine, cAMP, and cGMP were determined by HPLC method. **Conclusion** HPLC chromatographic fingerprint analysis technology can be used for the identification of jujube and its quality control.

Key words: *Ziziphus jujube* Mill.; HPLC; fingerprint; uracil; hypoxanthine; adenine; cytidine; uridine; cAMP; cGMP

红枣 *Ziziphus jujube* Mill. 又名大枣、中华大枣、华枣, 是鼠李科枣属植物枣树的果实。红枣具有很高的食用和药用价值, 是“药食两用”的上等补品。红枣中的环核苷酸及其衍生物有 10 多种, 主要为环磷酸腺苷 (adenosine 3',5'-cyclic monophosphate,

cAMP) 和环磷酸鸟苷 (guanosine-3',5'-cyclic phosphate, cGMP)^[1]。cAMP 是第 2 信使, 在调节基因表达、细胞增殖和抑制心脏疾病、过敏性疾病、细胞癌变等方面具有重要作用。医学研究证明至少 40 多种疾病, 包括癌症、高血压、冠心病、心肌梗

收稿日期: 2015-03-19

基金项目: 兵团科技局农社处科技援疆专项资助 (2013AB023); 浙江大学馥莉食品研究院基金资助项目 (KY201404); 塔里木大学研究生科研创新项目 (TDGRI201511)

作者简介: 刘 丹 (1988—), 女, 在读硕士研究生, 主要从事植物活性成分研究。E-mail: 15003066389@163.com

***通信作者** 白红进 (1967—), 男, 教授, 硕士生导师。E-mail: bhj67@163.com

死和心源性休克等重大疾病与 cAMP 的代谢有关^[3]。

本实验采用高效液相色谱法对塔里木盆地 17 个引进品种红枣的主要功效成分环核苷酸及其衍生物进行指纹图谱研究, 以期为红枣的品质评价和产品质量控制建立有效方法, 并对其果实中尿嘧啶、胞苷、次黄嘌呤、尿苷、腺嘌呤、cAMP 和 cGMP 7 种成分进行了测定分析。

1 仪器与材料

岛津高效液相色谱仪; AS3120A 超声提取器; BS224S 型电子天平; SPSS 19.0 统计软件。尿嘧啶(批号 RA0410FA14, 质量分数≥98%)、次黄嘌呤(批号 YT0502RA15, 质量分数≥98%)、腺嘌呤(批号 XJ0606MA14, 质量分数≥98%)、胞苷(批号 MM0316YA12, 质量分数≥99%)、尿苷(批号 TM0313XA13, 质量分数≥98%)、cAMP(批号 WD0813EA16, 质量分数≥99%)、cGMP(批号 SS0903GA13, 质量分数≥98%)对照品均购于上海源叶生物科技有限公司。

2014 年 10 月 16 日采集于塔里木大学植物科学院红枣资源圃嫁接一年生红枣, 密封冷冻保存。枣品种经塔里木大学植物科学学院园艺系吴翠云教授鉴定为鼠李科(Rhamnaceae)枣 *Zizyphus jujuba* Mill., 具体信息见表 1。甲醇为色谱纯, 水为娃哈哈纯净水, 其他试剂均为国产分析纯。

表 1 红枣来源信息

Table 1 Sources of *Z. jujube*

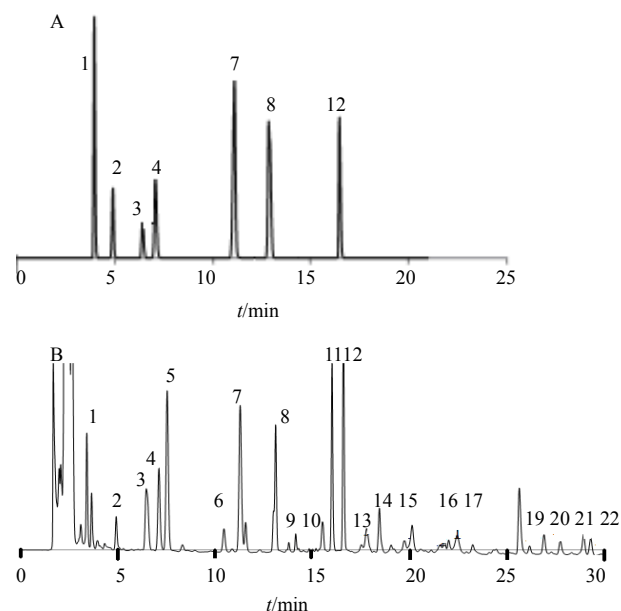
编号	品种	编号	品种
S1	金丝小枣	S10	骏枣 2
S2	大荔圆枣	S11	临县水团枣
S3	扁核枣	S12	灵宝大枣
S4	大白铃	S13	宁阳圆红枣
S5	阜帅	S14	三变红
S6	核桃纹	S15	上海白浦
S7	灰枣	S16	赞 2
S8	京 39	S17	枣强脆枣
S9	旧庄窝枣		

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: TOSOH TSKgel ODS-100V C₁₈ 柱(150 mm×4.6 mm, 3 μm), 流动相: 甲醇(A)-0.3%磷酸二氢钾缓冲水溶液(B), 梯度洗脱 0~2 min, 0% A; 2~5 min, 1% A; 5~9 min, 4% A; 9~13 min,

15% A; 13~21 min, 22% A; 21~27 min, 30% A; 27~30 min, 45% A; 体积流量 1 mL/min; 柱温 40 °C, 进样量 10 μL, 检测波长 260 nm。HPLC 谱图见图 1。



1-尿嘧啶 2-胞苷 3-次黄嘌呤 4-尿苷 7-腺嘌呤 8-cGMP 12-cAMP
1-uracil 2-cytidine 3-hypoxanthine 4-uridine 7-adenine 8-cGMP 12-cAMP

图 1 混合对照品 (A) 和样品 (B) HPLC 谱图

Fig. 1 HPLC of mixed reference substances (A) and samples (B)

2.2 对照品溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备 分别精密称取尿嘧啶、次黄嘌呤、腺嘌呤、胞苷、尿苷、cAMP、cGMP 对照品适量, 加水分别制成尿嘧啶、次黄嘌呤、腺嘌呤、胞苷、尿苷、cAMP、cGMP 1 mg/mL 的对照品储备液。

2.2.2 混合对照品溶液的制备 分别精密量取上述对照品储备液适量, 加水制成含尿嘧啶、次黄嘌呤、腺嘌呤、胞苷、尿苷、cAMP、cGMP 分别为 10、10、20、16、24、50、10 μg/mL 的混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备

取鲜枣 10 g (研磨), 精密称定, 置 100 mL 三角瓶中, 精密加入蒸馏水 50 mL, 称定质量, 超声提取 4 次, 每次 10 min, 放冷, 再称定质量, 用蒸馏水补足减失的质量, 摇匀, 滤过; 精密量取 1 mL, 过 0.45 μm 微孔滤膜, 得供试品溶液, 待测。

2.4 指纹图谱方法学考察

2.4.1 重复性试验 取 S1 样品 6 份, 按“2.3”项下的方法平行制备供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进行测定, 以共有峰的相对保留时间和相对峰

面积计算 RSD, 运用相似度评价系统, 将 6 次测定样品数据导入中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004A, 结果相对保留时间和相对峰面积 RSD 均小于 3.2%, 表明重复性良好。

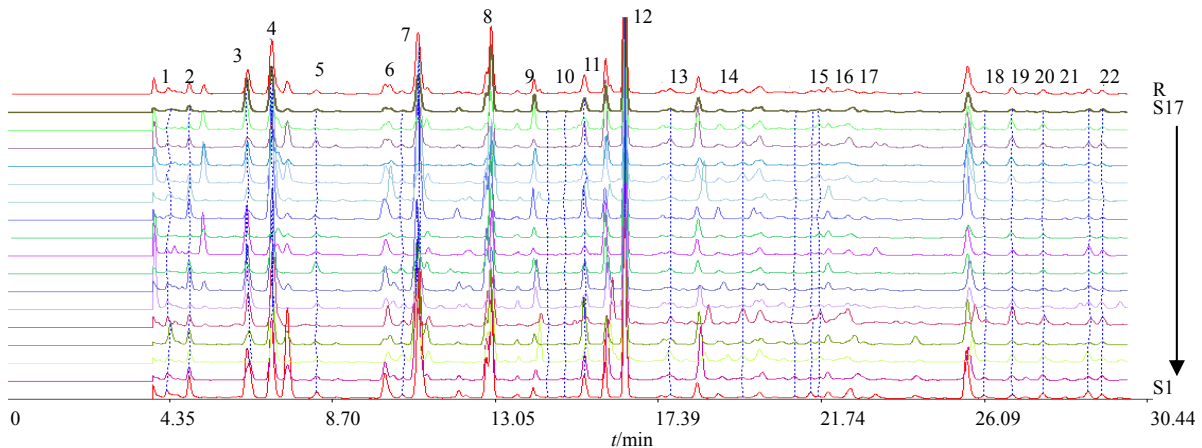
2.4.2 精密度试验 取 S1 样品 1 份, 按“2.3”项制备供试品溶液, 连续进样 6 次, 以共有峰的相对保留时间和相对峰面积为指标计算 RSD, 运用相似度评价系统, 将 6 次测定样品数据导入中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004A, 结果相对保留时间和相对峰面积 RSD 均小于 3.0%, 表明精密度良好。

2.4.3 稳定性试验 取 S1 样品 1 份, 按“2.1”项色谱条件分别在 0、2、4、8、12、24 h 进样检测, 以共有峰的相对保留时间和相对峰面积计算 RSD, 运用相似度评价系统, 将 6 次测定样品数据导入中药色谱指

纹图谱相似度评价系统 2004A, 结果相对保留时间和相对峰面积 RSD 均小于 2.3%。结果表明, 红枣指纹图谱测定方法具有可信的精密度和重复性, 供试品溶液在 24 h 内稳定, 可以获得可靠的指纹图谱。

2.5 指纹图谱的建立及相似度分析

分别取 17 批样品, 按“2.1”项色谱条件进行测定, 运用药典委员会中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004A 进行分析, 将实验数据导入中药色谱指纹图谱相似度评价软件, 设定 S1 为参照图谱, 将各色谱峰匹配, 建立指纹图谱, 见图 2, 其中 R 为指纹图谱共有模式, 并对实验数据进行相似度计算, 对照谱图采用“平均数”法生成, 然后生成对照图谱。共标定 22 个共有峰, 指认其中 7 个峰, 17 个不同品种红枣与对照谱之间的相似度结果见表 2。



1-尿嘧啶 2-胞苷 3-次黄嘌呤 4-尿苷 7-腺嘌呤 8-cGMP 12-cAMP
1-uracil 2-cytidine 3-hypoxanthine 4-uridine 7-adenine 8-cGMP 12-cAMP

图 2 17 批样品 HPLC 指纹图谱和共有模式

Fig. 2 HPLC fingerprint and common mode of 17 batches of samples

表 2 样品 HPLC 指纹图谱的相似度

Table 2 Similarities of HPLC fingerprint of each sample

编号	相似度	编号	相似度	编号	相似度
S1	0.899	S7	0.844	S13	0.858
S2	0.952	S8	0.852	S14	0.703
S3	0.851	S9	0.731	S15	0.914
S4	0.945	S10	0.803	S16	0.888
S5	0.768	S11	0.853	S17	0.920
S6	0.871	S12	0.856	R	1.000

2.6 指纹图谱聚类分析

以 17 批样品指纹图谱中 22 个共有峰的相对峰面积为变量, 运用 SPSS19.0 数据统计软件, 采用欧氏距离进行聚类分析研究, 结果见图 3。若将 17 批样品分为 3 类, 由图 3 可知, S11、S12、S2、S4、S1、S7、S3、S15、S6、S17、S5、S13、S16、S8、S14 为一类, S9 为一类, S10 为一类。

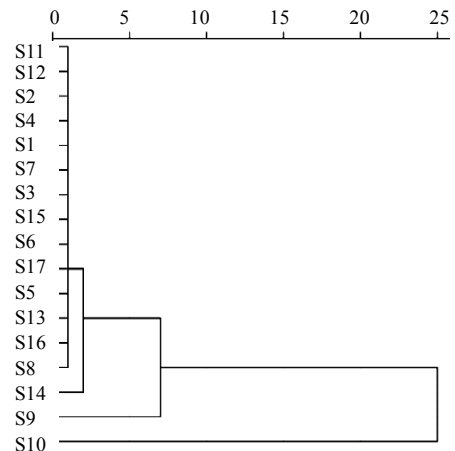


图 3 17 批样品的聚类分析

Fig. 3 Hierarchical cluster analysis of 17 batches of samples

2.7 定量测定

2.7.1 线性关系考察 分别取“2.2.2”项下的混合对照品溶液用水稀释成 5 个不同质量浓度的对照品

溶液, 每个质量浓度平行测定 3 次, 以质量浓度为横坐标 (X), 峰面积为纵坐标 (Y), 绘制标准曲线, 计算回归方程, 结果见表 3。

表 3 7 个化合物的线性回归方程及相关系数

Table 3 Linear regression equations and correlations of seven compounds

成分	回归方程	R^2	线性范围/ $(\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$
尿嘧啶	$Y=3\ 563.3\ X+2\ 456.8$	0.999 4	1.84~59.00
胞苷	$Y=1\ 727.8\ X+222.32$	0.999 9	1.80~18.00
次黄嘌呤	$Y=964.84\ X-155.57$	0.999 9	1.00~10.00
尿苷	$Y=2\ 596.9\ X+394.21$	0.999 9	1.58~50.60
腺嘌呤	$Y=5\ 064.6\ X+2\ 943.3$	0.999 5	1.63~52.10
cGMP	$Y=3\ 871.8\ X+1\ 716.3$	0.999 4	0~50.00
cAMP	$Y=2\ 991.4\ X+1\ 330$	0.999 4	0~50.00

2.7.2 精密度考察 取同一对照品混合溶液, 在“2.1”项的色谱条件下重复进样 5 次, 测得各共有色谱峰的相对峰面积的 RSD 均小于 1%, 表明仪器精密度良好。

2.7.3 重复性试验 取 S1 号样品 5 份, 每份约 10 g, 精密称定, 按“2.3”项下方法平行制备成供试品溶液, 在“2.1”项的色谱条件下进样测定, 结果显示, 各共有色谱峰的相对峰面积的 RSD 均小于 3%, 表明方法重复性良好。

2.7.4 稳定性试验 取 S1 号供试品溶液, 在“2.1”项的色谱条件下, 分别在 0、2、4、8、12、24 h 进样, 测得各共有色谱峰的相对峰面积的 RSD 均小于 3%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.7.5 加样回收率试验 精密量取 5 份已测定的供试品溶液, 每份 1 mL, 分别加入 1 mL 混合对照品

溶液(尿嘧啶、次黄嘌呤、腺嘌呤、胞苷、尿苷、cAMP、cGMP 质量浓度分别为 10、10、20、16、24、50、10 $\mu\text{g/mL}$), 按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 在“2.1”项的色谱条件下测定并计算 5 份样品中 7 种成分的平均加样回收率和 RSD。结果表明, 尿嘧啶、次黄嘌呤、腺嘌呤、胞苷、尿苷、cAMP、cGMP 的平均加样回收率分别为 95.51%、98.82%、101.41%、100.54%、93.95%、97.68%、95.58%, RSD 分别为 2.08%、1.91%、1.34%、1.17%、2.36%、1.35%、2.65%。

2.7.6 样品测定 取鲜枣 10 g (研磨), 精密称定, 按“2.3”项下的方法制备供试品溶液, 在“2.1”色谱条件下分别进样 10 μL 进行测定, 采用外标法计算样品中 7 种成分的质量分数, 结果见表 4。对 17 个外引品种红枣中尿嘧啶、次黄嘌呤、腺嘌呤、胞苷、尿苷、cAMP、cGMP 进行定量测定。尿嘧啶量

表 4 新鲜红枣中 7 个成分的量

Table 4 Seven component contents in fresh *Z. jujube*

编号	尿嘧啶/ $(\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1})$	胞苷/ $(\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1})$	次黄嘌呤/ $(\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1})$	尿苷/ $(\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1})$	腺嘌呤/ $(\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1})$	cGMP/ $(\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1})$	cAMP/ $(\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1})$
S1	122.24	314.18	1 192.73	764.16	712.86	402.75	1 163.24
S2	49.49	192.85	443.33	586.34	637.06	318.50	1 095.25
S3	32.01	196.84	49.20	576.02	425.86	522.92	1 585.31
S4	28.76	236.88	345.30	602.50	568.88	310.22	904.24
S5	86.36	170.25	648.28	859.19	168.34	144.02	631.24
S6	347.99	86.17	866.88	41.47	388.61	424.38	1 535.51
S7	82.12	332.11	846.42	1 038.56	495.49	253.14	656.65
S8	31.31	157.84	194.82	395.32	155.23	659.67	2 063.17
S9	175.37	53.36	979.79	162.24	6.71	209.94	528.94
S10	109.76	37.31	79.10	40.28	22.25	224.13	574.49
S11	81.85	287.43	261.45	1 142.05	753.69	286.45	830.37
S12	70.45	294.26	250.15	1 108.82	841.32	284.84	805.87
S13	131.37	139.00	542.89	424.15	72.84	332.57	719.95
S14	93.73	61.22	431.97	360.08	9.67	104.99	191.39
S15	159.84	154.29	270.03	248.22	271.99	475.41	1 118.12
S16	119.87	90.23	511.49	351.65	78.29	181.85	530.18
S17	32.51	91.79	586.75	434.00	208.94	270.35	881.44

为 28.76~347.99 $\mu\text{g/g}$, 胞苷量为 37.31~332.11 $\mu\text{g/g}$, 次黄嘌呤量为 49.20~1 192.73 $\mu\text{g/g}$, 尿苷质量分数为 40.28~1 142.05 $\mu\text{g/g}$, 腺嘌呤量为 6.71~841.32 $\mu\text{g/g}$, cGMP 量为 104.99~659.67 $\mu\text{g/g}$, cAMP 量为 191.39~2 063.17 $\mu\text{g/g}$ 。

3 讨论

对供试品溶液分别超声提取 1~6 次, 分别收集不同提取次数的提取液进行分析, 结果表明不同提取次数的提取率不同, 提取次数大于 1 次时, cAMP 的提取率有所提高, 提取次数大于 5 次时, cAMP 的提取率变化不明显, 考虑到操作简单的因素, 因此选择超声提取次数为 4 次。

在本实验条件下, 大多数色谱峰都得到了较好地分离。本实验对 17 批样品进行了 HPLC 指纹图谱构建和解析, 标定了 22 个共有峰, 和已知对照品相比较, 指认其中 7 个峰, 其中, 峰 1、2、3、4、7、8 和 12 分别是尿嘧啶、胞苷、次黄嘌呤、尿苷、腺嘌呤、cGMP、cAMP。对 17 批样品进行了系统聚类分析, 结果表明这 17 批样品可分为 3 类, 旧庄窝枣为一类, 骏枣 2 为一类, 其余为一类。从分析结果可看出, 17 批样品质量较稳定, 均一性较好。本方法精密度、重复性、稳定性较好, 本实验对红枣的 HPLC 指纹图谱进行多方面的比较考察, 得到的结果可靠, 可用于红枣品质的综合评价。

参考文献

- [1] 姜晓燕. 灵武长枣中活性物质及总抗氧化能力的研究 [D]. 天津: 天津科技大学, 2010.
- [2] 刘孟军, 王永惠. 枣和酸枣等 14 种园艺植物 cAMP 含量的研究 [J]. 河北农业大学学报, 1991, 14(4): 20-23.
- [3] 王向红. 枣果主要活性成分分析方法及其综合加工技术研究 [D]. 石家庄: 河北农业大学, 2003.
- [4] 肖蓉, 张志斐, 韩学静, 等. 不同产地柴胡药材 GC-MS 指纹图谱研究 [J]. 中草药, 2006, 37(8): 1248-1252.
- [5] 李强, 杜思邈, 张忠亮. 中药指纹图谱技术进展及未来发展方向展望 [J]. 中草药, 2013, 44(22): 3095-3104.
- [6] 曹建军, 梁宗锁, 杨东风. 地黄 HPLC-DAD 多波长指纹图谱的建立及其在熟地黄炮制中的应用 [J]. 中草药, 2014, 45(2): 265-270.
- [7] 黄立兰, 程文胜, 陈耀娣. 人参指纹图谱的研究进展 [J]. 中草药, 2013, 44(2): 241-246.
- [8] 高新彪, 孙磊, 乔善义, 等. 牡丹皮 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 中草药, 2013, 44(7): 900-904.
- [9] 覃洁萍, 冯旭, 邓家刚, 等. 枳果叶 HPLC 指纹图谱共有模式的建立及在近缘品种扁桃叶鉴别中的应用 [J]. 中草药, 2010, 41(9): 1543-1546.
- [10] Zhao G, Peng L X, Wang S, *et al.* HPLC fingerprint-antioxidant properties study of buckwheat [J]. *J Integr Agric*, 2012, 11(7): 1111-1118.