

酸枣叶 HPLC 指纹图谱研究

王 相^{1,2,3}, 张 闯¹, 范帅帅¹, 王 梦¹, 牛丽颖^{1,2,3*}

1. 河北中医学院, 河北 石家庄 050091

2. 河北省中药配方颗粒工程技术研究中心, 河北 石家庄 050091

3. 河北省高校中药配方颗粒应用技术研发中心, 河北 石家庄 050091

摘要: 目的 建立酸枣叶药材的 HPLC 指纹图谱, 为其质量标准的研究提供依据。方法 采用 Kinetex C₁₈ 色谱柱 (100 mm×2.1 mm, 2.6 μm); 流动相为乙腈-0.1%磷酸水溶液, 梯度洗脱; 体积流量为 300 μL/min; 柱温 30℃, 检测波长 225 nm, 进样量 10 μL, 对 12 批酸枣叶药材进行了指纹图谱研究, 采用中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2012 版) 软件进行分析。结果 12 批酸枣叶的 HPLC 指纹图谱有 13 个共有峰, 其中 1 个共有峰得到确认, 相似度均>0.85。结论 该方法准确可靠, 重复性好, 为更好地控制酸枣叶内在质量提供科学依据。

关键词: 酸枣叶; 芦丁; 指纹图谱; HPLC

中图分类号: R965.2

文献标志码: A

文章编号: 1674-6376 (2017) 06-0797-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2017.06.013

HPLC Fingerprint study of *Ziziphi Spinosae Folium*

WANG Xiang^{1,2,3}, ZHANG Chuang¹, FAN Shuai-shuai¹, WANG Meng¹, NIU Li-ying^{1,2,3}

1. Hebei University of Chinese Medicine, Shijiazhuang 050091, China

2. Hebei TCM Formula Granule Engineering & Technology Research Center, Shijiazhuang 050091, China

3. TCM Formula Granule Research Center of Hebei Province University, Shijiazhuang 050091, China

Abstract: Objective To establish a specific HPLC method and a standard fingerprint for quality control of *Ziziphi Spinosae Folium*.

Methods The samples were separated on a Kinetex C₁₈ column (100 mm × 2.1 mm, 2.6 μm) by gradient elution at the flow rate of 300 μL/min using acetonitrile and 0.1% aqueous formic acid as the mobile phase. The column temperature was 30℃. The detection wavelength was 225 nm and the sample size was 10 μL. The fingerprint evaluation software (2012 edition) for Chinese materia medica (CMM) was used to evaluate the similarity of the 12 batches of samples. **Results** There were 13 characteristic peaks identified in the characteristic spectra of *Ziziphi Spinosae Folium* samples. Peak 6 was Rutin. The similarities of 13 batches of *Ziziphi Spinosae Folium* samples were proved to be higher than 0.850. **Conclusion** The method is available with a good reproducibility and accuracy which can control the quality standards effectively.

Key words: *Ziziphi Spinosae Folium*; rutin; fingerprint; HPLC

酸枣叶为鼠李科植物酸枣 *Ziziphus jujuba* Mill. var. *spinosa* (Bunge) Huex H.F. Chou 的干燥叶子。具有养心、安神、助眠等功效, 被誉为“东方睡叶”^[1]。《中药大辞典》称其为“棘叶”, 主治脘腹痞, 具麻醉作用^[2], 民间多用于泡水代茶饮来治疗高血压、失眠。研究表明酸枣叶对冠心病也有较好的临床疗效^[3]。酸枣叶中主要含有黄酮、皂苷类及

三萜类等化学成分。其中黄酮类化合物是酸枣叶的主要成分, 目前所检索到的有关酸枣叶的文献大多是对其黄酮类成分进行测定^[4-5]。为确保和控制酸枣叶质量的稳定性, 本实验对 12 批酸枣叶进行了指纹图谱分析和相似度的计算, 不同来源酸枣叶特征峰之间存在差异, 表明其所含成分的量不尽相同, 该方法能够从整体上控制酸枣叶的质量, 达到鉴别真

收稿日期: 2017-01-03

基金项目: 河北省自然科学基金项目 (H2015423026); 河北省高等学校科学技术研究项目 (ZD2015001); 河北省中医药管理局科研计划项目 (2017013)

作者简介: 王 相, 女, 助理实验师, 研究方向为中药质量控制。

*通信作者 牛丽颖, 女, 教授, 研究方向为中药质量控制与中药药效物质基础。Tel: (0311)89926548 E-mail: niuliyinggy@163.com

伪、评定优劣的目的,为酸枣叶的质量控制提供科学依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Ultimate 3000 高效液相色谱仪(低压三元梯度泵,自动进样器,DAD 检测器),美国赛默飞公司;变色龙色谱工作站,美国赛默飞公司;Kinetex C₁₈ 色谱柱(100 mm×2.1 mm, 2.6 μm),美国菲罗门公司;TB-215D 电子天平(十万分之一),德国赛

多利斯。

1.2 材料

对照品芦丁(中国食品药品检定研究院,批号100080-201408);乙腈为色谱纯,水为超纯水,其他试剂均为分析纯。

1.3 药材

所有酸枣叶样品经孙宝惠老师鉴定均为鼠李科植物酸枣 *Ziziphus jujuba* Mill. var. *spinosa* (Bunge) Huex H.F. Chou 的干燥叶子。样品来源见表1。

表1 样品来源

Table 1 Sources of Samples

编号	产地	批号	编号	产地	批号
S1	河北邢州	HB201601	S7	河北承德	HB201607
S2	河北安国	HB201602	S8	河北廊坊	HB201608
S3	河北赞皇	HB201603	S9	河北唐山	HB201609
S4	河北石家庄	HB201604	S10	河北张家口	HB201610
S5	河北邢台	HB201605	S11	河北秦皇岛	HB201611
S6	河北邯郸	HB201606	S12	河北沧州	HB201612

2 方法与结果

2.1 色谱条件与系统适用性试验

采用 Kinetex C₁₈ 色谱柱(100 mm×2.1 mm, 2.6 μm) 色谱柱,以乙腈(A)-0.1%磷酸水溶液(B)为流动相梯度洗脱,梯度洗脱程序见表2;波长225 nm;体积流量300 μL/min;柱温30℃;进样量10 μL。

表2 梯度洗脱程序

Table 2 Gradient elution programs

时间/min	A/%	B/%
0	5	95
5	5	95
15	12	88
30	15	85
40	30	70
45	5	95

2.2 对照品溶液的制备

精密称取芦丁对照品适量,置2 mL 量瓶中,以甲醇溶解并定容至刻度,摇匀,得质量浓度为1.0 mg/mL 的对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备

取酸枣叶细粉(过5号筛)约0.1 g,精密称定,置锥形瓶中,精密加入甲醇20 mL,称定质量,超声30 min,冷却至室温,再称定质量,并用甲醇补足缺失的质量,摇匀,经0.45 μm 微孔滤膜滤过,

取续滤液作为供试品溶液。

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度试验 精密吸取 S1 样品供试品溶液10 μL,按“2.1”项下色谱条件,连续进样6次,记录色谱图,以6号峰为参照峰,其保留时间和峰面积为1,计算出13个共有峰的相对保留时间和相对峰面积 RSD 值均小于3%,结果表明,仪器精密度良好。

2.4.2 重复性试验 取 S1 样品供试品溶液6份,每份精密吸取10 μL,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱图,以6号峰为参照峰,其保留时间和峰面积为1,计算出13个共有峰的相对保留时间和相对峰面积 RSD 值均小于3%,结果表明,重复性好。

2.4.3 稳定性试验 精密吸取 S1 样品供试品溶液10 μL,按“2.1”项下色谱条件,于0、3、6、9、12 h 进样测定,记录色谱图,以6号峰为参照峰,其保留时间和峰面积为1,计算出13个共有峰的相对保留时间和相对峰面积 RSD 值均小于3%,结果表明,供试品溶液12 h 内稳定。

2.5 河北省酸枣叶指纹图谱的建立及评价

2.5.1 参照峰的选择 精密量取“2.2.1”项下对照品溶液和供试品溶液各10 μL,注入 HPLC 仪,进行测定,记录色谱图。酸枣叶经“2.1”项下色谱条

件分析后出现多个色谱峰,以芦丁(S)作为参照峰。

2.5.2 酸枣叶指纹图谱的建立 取12批河北省酸枣叶各适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进行测定,记录色谱图(图1)。根据12批样品特征图谱的特点,确定13个峰作为共有峰,并标定了其中1个色谱峰,其中6号峰为芦丁且分离度较好,保留时间适宜,因此可作为参照峰,将各批酸枣叶的特征图谱信号导入国家药典委员会颁布的《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012版)》,计算生成对照特征图谱,12批药材特征指纹图谱的共有模式详见图2,并计算对照图谱和12批样品图谱之间的相似度数据,相似度计算结果见表3。

2.5.3 不同采收期酸枣叶指纹图谱初探 实验中对不同月份3批酸枣叶进行指纹图谱研究(分别为S1、S3、S4产地4、5、6月份酸枣叶样品,编码为B1-B9),不同月份采集酸枣叶指纹图谱见图3。结果表明,不同月份采收的酸枣叶指纹图谱在出峰时间上基本保持一致,但是含量差异较大,6号峰芦丁含量从4月份到10月份持续下降,但8号峰含量差异不大,其他峰含量基本保持降低,由此可见,酸枣叶最佳采收期应拟定为4月份,即初春采摘最为适宜。

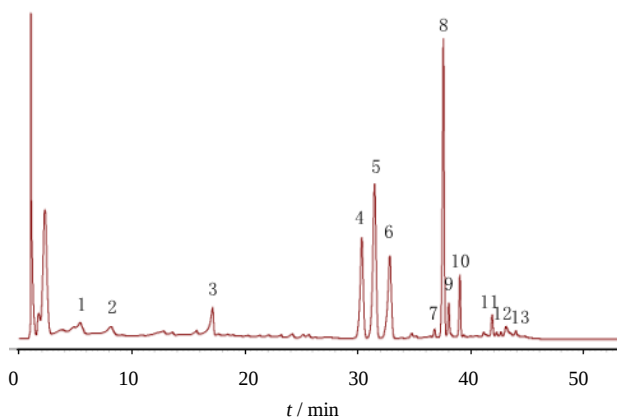


图1 酸枣叶药材指纹图谱共有模式

Fig. 1 Fingerprint pattern of *Ziziphi Spinosae Folium*

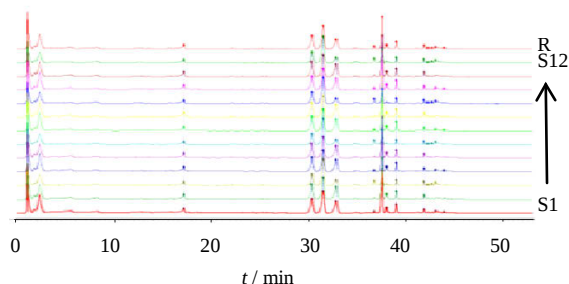


图2 12批酸枣叶指纹图谱

Fig. 2 HPLC fingerprints of 12 batches *Ziziphi Spinosae Folium*

表3 不同产地指纹图谱相似度

Table 3 Similarity of HPLC fingerprints for *Ziziphi Spinosae Folium* from different collections

编号	相似度
S1	0.998
S2	0.875
S3	0.996
S4	0.990
S5	0.993
S6	0.899
S7	0.931
S8	0.906
S9	0.986
S10	0.972
S11	0.957
S12	0.916

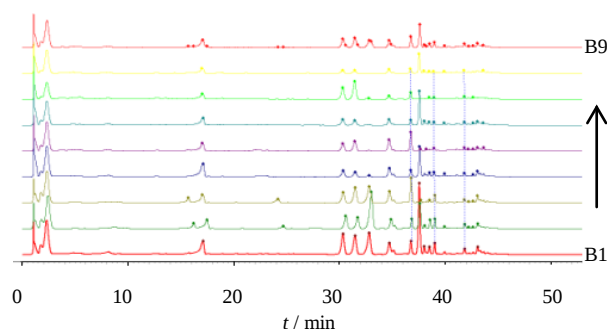


图3 不同采收时间酸枣叶指纹图谱

Figure 3 *Ziziphi Spinosae Folium* fingerprint in different harvest time

3 讨论

3.1 检测波长的选择

试验过程对酸枣叶甲醇提取液、芦丁对照品溶液分别进行紫外全波长扫描,结果2种供试品在225 nm波长处均有较大吸收,且在该波长下色谱峰较多。因此选择225 nm作为测定波长。

3.2 色谱柱的选择

实验过程中比较了Wondasil C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm), ReproSil-Pur Basic C₁₈ (100 mm×2 mm, 2.5 μm), Kinetex C₁₈ (100 mm×2.1 mm, 2.6 μm)色谱柱。通过比较,本实验研究予以采用Kinetex C₁₈ (100 mm×2.1 mm, 2.6 μm)色谱柱,该色谱柱能较好地将酸枣叶中多种成分分离,且峰形较好,分离时间较普通色谱柱分离时间大大减少,因此,选用该色谱柱进行酸枣叶特征图谱的测定。

3.3 流动相系统的选择

实验中对比了甲醇-0.1%磷酸水溶液、乙腈

-0.1%磷酸水溶液等流动相系统,考察了该流动相等度洗脱、多种梯度洗脱方式,结果表明,以乙腈-0.1%磷酸水溶液为流动相,梯度洗脱所得谱图特征峰出现时间适宜,且峰形明显较好,分离度好,基线漂移小,因此以乙腈-0.1%磷酸水溶液为流动相系统。

3.4 提取溶剂的选择

实验中对比了水、30%甲醇、50%甲醇、70%甲醇、乙醇、醋酸乙酯作为溶剂进行提取,结果表明,以甲醇作为溶剂进行提取,所得指纹图谱峰较多,且峰高较高,提取效率相对较好。因此选择甲醇最为提取溶剂进行提取。

综上所述,本实验对河北省不同产地的12批酸枣叶进行了特征图谱研究,通过国家药典委员会颁布的《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012版)》,得到酸枣叶的对照特征图谱,以及12批药材对于对照特征图谱的相似度。同时本实验又对不同采收时间酸枣叶指纹图谱进行研究,给出酸枣叶采

收最佳时期,为酸枣叶产品的开发提供了科学依据。综上所述,本研究采用HPLC色谱法建立的酸枣叶特征图谱分析方法简便、准确、重复性好,为有效地控制酸枣叶的内在质量标准提供科学依据。

参考文献:

- [1] 王僧虎,石晓云.邢台山区野生酸枣叶成分测定及开发利用[J].北方园艺,2012,(17):39-40.
- [2] 江苏新医学院.中药大辞典[M].下册.上海:上海科学技术出版社,1977:2304.
- [3] 赵新华,伊丽楠.酸枣叶提取物对中枢神经系统作用的实验研究[J].时珍国医国药,2009,2(20):463-466.
- [4] 张茹潭,陈军辉,史倩,等.崂山酸枣叶茶中芦丁含量测定及芦丁利用研究[J].时珍国医国药,2014,25(1):13-15.
- [5] 张倩倩,崔庆玲,刘晓秋,等.HPLC法同时测定酸枣叶中芦丁等4种黄酮苷含量[J].沈阳药科大学学报,2014,31(1):26-30.