

的生根率达95%以上,户外移栽苗的成活率也比已有方法显著提高,达90%以上。和已有方法相比,本试验缩短了离体繁殖时间,建立了乌头的高效快繁体系。

光照1500~2000 lx, LH 200 mg/L 与对照相比对愈伤组织的诱导无明显差异,但前者对愈伤组织的增殖和丛生芽的生长具有一定的促进作用,这种作用可能是由于某些胚性愈伤组织中部分细胞具有了叶绿体,从而能将部分光能转化成自身所需的化学能,而LH由于具有多种氨基酸成分,能满足愈伤组织生长中对营养的大量需求。培养基中附加3 g/L的PVP与3 g/L的AC均有一定的抗褐化作用,这种作用是由于它们吸附了外植体产生的酚类物质经空气氧化后形成的醌类物质,但随着它们分子吸附空间的饱和,吸附量减少,表现为抗褐化能力亦随之减弱;在愈伤组织的形态及诱导率方面,前者优于后者,这种差异可能是二者在吸附醌类物质的同时也吸附了一定量的外源植物激素,而0.5%的PVP作用后剩余的外源植物激素的量刚好适宜愈伤组织的诱导和生长;在丛生芽诱导生根方面,后者优于前者,可能是因为AC提供了植株习惯的类似土壤中生长的黑暗环境^[1]。

利用种子做外植体,具有不受季节影响,初代培

养污染率较低等优点。本试验以种子为外植体的诱导率还不高,培养时间也较长,具体影响因子有待进一步的研究。另外,国内外对乌头愈伤组织中次生代谢物的研究也较少,若能直接从其愈伤组织中提取次生代谢物,将具有巨大的商业价值。

References:

- [1] Li J M. *Tutorial of Plant Tissue Culture* (植物组织培养指南) [M]. Beijing: China Agricultural University Press, 2002.
- [2] Hu Y Y, Wu G Q. Tissue culture and regeneration of *Aconitum carmichaeli* Debx. [J]. *Plant Physiol* (植物生理学通讯), 1985, 16(2): 37-40.
- [3] Lin J, He Y. A probe into fast reproduction technic of *Aconitum carmichaeli* Debx. [J]. *Guizhou Sci* (贵州科学), 1998, 16(2): 120.
- [4] Guan W L, Wang L, Zheng S X. The establishment of *Aconitum carmichaeli* Debx. plant regenerating system [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2003, 34(6): 561-563.
- [5] Wang Y H, Ma D W, Huang Z Z, et al. Application of orthogonal test method on culture tissue of *Aconitum carmichaeli* Debx. [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2005, 30(15): 1197-1199.
- [6] Zhang Z X, Ting W X, Ding W Q, et al. Research on tissue culture of *Pulsatilla chinensis* (Bunge) Regel [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2004, 29(3): 216-217.
- [7] Qu S P, Chen W, Qu Y H, et al. Rapid propagation of *Aconitum carmichaeli* seedling by tissue culture [J]. *Chin Wild Plant Resour* (中国野生植物资源), 2004, 23(4): 62-63.

河北道地药材酸枣仁 HPLC-ELSD 指纹图谱研究

张志斐^{1,2}, 袁志芳¹, 张兰桐^{1*}, 范丽芳¹, 冯锐¹

(1. 河北医科大学药学院 药物分析教研室, 河北 石家庄 050017; 2. 华北煤炭医学院 药理学系, 河北 唐山 063000)

摘要:目的 建立河北道地药材酸枣仁的 HPLC-ELSD 指纹图谱, 为科学评价及有效控制酸枣仁药材质量提供新方法。方法 收集不同产地酸枣仁药材 21 批, 采用 HPLC-ELSD 法测定其指纹图谱。色谱条件: C₁₈柱, 乙腈-水为流动相进行梯度洗脱, ELSD 检测器, 体积流量 1.0 mL/min, 柱温 35 ℃。结果 建立了道地酸枣仁药材 HPLC-ELSD 指纹图谱共有模式, 并对不同产地酸枣仁药材进行了相似度比较。结论 方法简便、可靠, 可用于不同产地酸枣仁药材的指纹图谱测定和质量评价, 为有效控制酸枣仁药材的内在质量提供依据。

关键词:酸枣仁; 酸枣仁皂苷; 高效液相色谱法; 指纹图谱

中图分类号: R282.7

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2007)08-1247-04

HPLC-ELSD Fingerprints of genuine *Semen Ziziphi Spinosae* from Hebei Province

ZHANG Zhi-fei^{1,2}, YUAN Zhi-fang¹, ZHANG Lan-tong¹, FAN Li-fang¹, FENG Rui¹

(1. Department of Pharmaceutical Analysis, School of Pharmacy, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China;

2. Department of Pharmacy, North China Coal Medical College, Tangshan 063000, China)

收稿日期: 2006-11-12

基金项目: 河北省自然科学基金项目 (303453)

作者简介: 张志斐 (1972—), 女, 硕士研究生, 副教授, 主要从事中药指纹图谱研究。

* 通讯作者 张兰桐 Tel: (0311) 86266419 E-mail: zhanglantong@263.net

Abstract: Objective To establish a fingerprint analysis method for identification and effective quality control of genuine *Semen Ziziphi Spinosa* from Hebei Province. **Methods** The HPLC-ELSD fingerprints for 21 batches of *Semen Ziziphi Spinosa* from different habitats were obtained by Waters 1525 HPLC instruments. The HPLC separation was performed on a C₁₈ analytical column gradient elution with a mixture consisting of acetonitrile and water at a flow rate of 1.0 mL/min by ELSD detector. The temperature of column was 35 °C. **Results** The mutual model of HPLC-ELSD fingerprints was set up and the similarities to the crude drugs from different habitats were compared. **Conclusion** It is simple and quick to identify *Semen Ziziphi Spinosa* from different sources with the above-mentioned method which can be used as a quality control item for *Semen Ziziphi Spinosa*.

Key words: *Semen Ziziphi Spinosa*; jujuboside; HPLC; fingerprints

酸枣仁为鼠李科植物酸枣 *Ziziphus jujube* 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,是河北道地药材。近年来,由于药材市场的开放,酸枣仁商品药材中不断发现以它种植物种子混充,比较常见的有同科植物滇刺枣 *Z. mauritiana* Lam. 的成熟种子,以滇枣仁、缅枣仁或理枣仁之名混充酸枣仁,也有同科植物北枳椇 *Hovenia dulcis* Thunb. 种子掺入正品酸枣仁中,导致酸枣仁药材及其制剂质量不稳定,从而影响了其疗效。现代药理研究表明,酸枣仁皂苷为其镇静催眠有效成分之一。本文对酸枣仁皂苷类成分的指纹图谱进行研究,获得对照指纹图谱,旨在建立河北道地药材酸枣仁 HPLC-ELSD 指纹图谱的共有模式,以此作为与混伪品区别的标准模式,以避免同科属近缘种的伪充,同时对不同产地酸枣仁药材进行了相似度比较,以期评价其质量的优劣,从而有效控制酸枣仁药材的内在质量。

1 材料

1.1 仪器与试剂:Waters 1525 高效液相色谱仪;Waters 2420 检测器 (ELSD);Empower 工作站;SCQ-200 超声波清洗器 (上海声谱超声波设备厂);SZ-93 自动双重纯水蒸馏器 (上海亚荣生化仪器厂);旋转薄膜蒸发器 (Heidolph 2, Laboratory 4000)。乙腈为色谱纯 (美国迪马公司);水为二次重蒸水;其他试剂均为分析纯。

1.2 对照品与样品:酸枣仁皂苷 A 对照品 (供鉴别用,批号:734—9404);酸枣仁皂苷 B 对照品 (供鉴别用,批号:814—9402);酸枣仁对照药材 (批号:121517—200401) 均由中国药品生物制品检定所提供;不同产地酸枣仁药材样品经河北医科大学药学院生药学教研室聂晨教授和邯郸市药品检验所孔增科主任药师鉴定,来源见表 1。21 个不同产地的酸

表 1 酸枣仁药材来源

Table 1 Origins of *Semen Ziziphi Spinosa* samples

样品号	样品来源	备 注
1	河北承德六沟	河北道地药材
2	河北承德县(下板城)	河北道地药材
3	河北承德宽城青龙	河北道地药材,早期采
4	河北承德宽城青龙	河北道地药材,成熟期采
5	河北唐山遵化迁西一带	河北道地药材
6	河北石家庄赞皇	河北道地药材
7	河北邢台内邱县	河北道地药材
8	河北邯郸武安坦岭村	河北道地药材
9	河北涉县	河北道地药材
10	河北涉县	河北道地药材,炒制
11	中国药品生物制品检定所	对照药材
12	山西运城左权县	
13	山西运城左权县	炒制
14	河北	有混伪
15	四川雅安	
16	山东	
17	陕西铜川	
18	陕西宝鸡	
19	云南理枣仁	伪品
20	河南三门峡	
21	辽宁朝阳地区	

枣仁药材样品 (其中 1~10 号样品为道地酸枣仁),将样品置烘箱内,于 40 °C 烘干 8 h,取出,粉碎,置广口瓶中密塞,备用。

2 方法与结果

2.1 色谱条件^[2]:色谱柱为 Diamonsil™ C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm);乙腈 (A)-水 (B) 为流动相进行梯度洗脱;运行时间 55 min,0~5 min:A-B (5:95),5~30 min 从 5:95 变化到 30:70;30~50 min 从 30:70 变化到 70:30;50~55 min 从 70:30 变化到 5:95;体积流量为 1.0 mL/min;柱温为 35 °C;ELSD 检测器;氮气压力为 172.4 kPa;漂移管温度为 60 °C;喷口温度 35 °C;进样量 20 μL。

2.2 供试品溶液的制备:酸枣仁药材粉碎,取约 2.0 g,精密称定,置索氏提取器中,加入石油醚 100 mL,浸泡过夜 (12 h),回流提取 24 h。药渣挥干溶剂后,

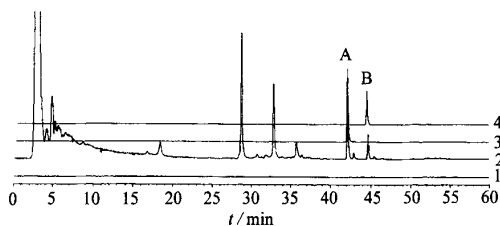
转移至 50 mL 三角瓶中,精密加入甲醇 20 mL,称定质量,超声处理 1 h,放冷至室温,再称定质量,补足损失的甲醇,摇匀。滤过,滤液回收至干,残渣精密加甲醇 2 mL 使溶解,用微孔滤膜 (0.45 μm) 滤过,12 000 r/min 离心 10 min,吸取上清液,即得。

2.3 对照品溶液的制备:分别取酸枣仁皂苷 A、B 对照品适量,精密称定,加甲醇溶解并稀释制成 1 mg/mL 溶液,作为对照品溶液 A、B。

2.4 系统适用性试验:取上述供试品溶液 20 μL ,注入液相色谱仪,记录色谱图,按酸枣仁皂苷 A 峰计算理论板数约为 4 000,与其他色谱峰分离度大于 1.5。

2.5 方法学考察^[3]

2.5.1 专属性试验:分别精密吸取空白溶剂、对照品溶液 A、B 及供试品溶液各 20 μL ,注入液相色谱仪,记录 60 min 内的色谱峰。在该色谱条件下,空白溶剂甲醇对测定无干扰,对照品溶液 A 和 B 分别于 41.7 min 和 43.9 min 出峰,与供试品溶液相对应。色谱图见图 1。



A-酸枣仁皂苷 A B-酸枣仁皂苷 B
A-jujuboside A B-jujuboside B

图 1 空白(1)、对照品(3、4)及供试品溶液(2)的色谱图

Fig. 1 HPLC-ELSD Chromatograms of blank (1), reference substance (3 and 4), and *Semen Ziziphi Spinosa* sample solution (2)

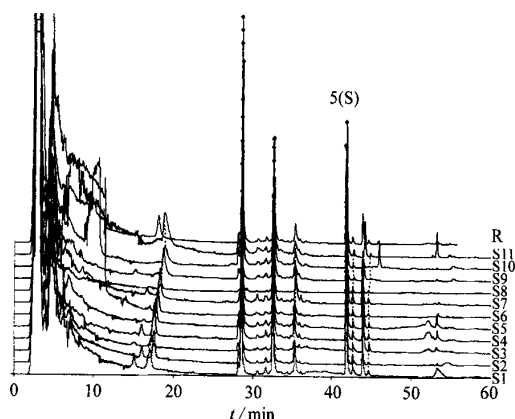
2.5.2 精密度试验:取 5 号酸枣仁样品粉末,精密称定,制备供试品溶液,重复进样 6 次,记录指纹图谱。将指纹图谱信号数据导入中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2004A),计算 6 次进样指纹图谱的相似度。结果表明,6 次进样指纹图谱的相似度均高于 0.99,符合指纹图谱测定要求,精密度良好。

2.5.3 重现性试验:取 5 号酸枣仁样品粉末 6 份,精密称定,制备供试品溶液,分别进样,记录指纹图谱。计算 6 份样品所得指纹图谱的相似度。结果表明,6 份样品指纹图谱的相似度均高于 0.98,符合指纹图谱测定要求,重现性良好。

2.5.4 稳定性试验:取 5 号酸枣仁样品液,分别于 0、2、4、6、8、10、12、24、36、48 h 检测指纹图谱,计算

48 h 内所得指纹图谱的相似度。结果表明,48 h 内指纹图谱的相似度均高于 0.98,符合指纹图谱测定要求,稳定性良好。

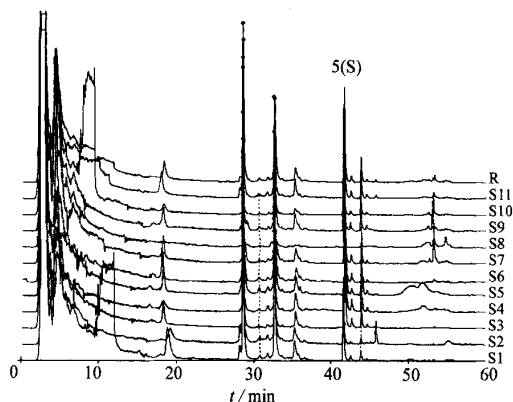
2.6 道地酸枣仁药材指纹图谱的建立及对照指纹图谱的生成^[4]:取 1~11 号酸枣仁药材供试品溶液,分别进样 20 μL ,得到 10 批河北道地酸枣仁药材和 1 批对照药材的指纹图谱,同时生成对照指纹图谱。见图 2。



S1~S10-样品 1~10 S11-对照药材
R-对照指纹图谱 5(S)-酸枣仁皂苷 A
S1~S10-samples 1~10 S11-reference samples
R-reference fingerprint 5(S)-jujuboside A

图 2 河北道地酸枣仁药材 HPLC-ELSD 指纹图谱
Fig. 2 HPLC-ELSD Fingerprints of genuine *Semen Ziziphi Spinosa* samples from Hebei Province

2.7 不同产地酸枣仁药材指纹图谱的建立:取不同来源的酸枣仁药材 (12~21 号样品),制备供试品溶液,分别取 20 μL 进样,得 10 批不同来源酸枣仁药材的指纹图谱,见图 3。



S1~S10-样品 12~21 S11-对照指纹图谱 5(S)-酸枣仁皂苷 A
S1~S10-samples 12~21 S11-reference fingerprint 5(S)-jujuboside A

图 3 不同产地酸枣仁药材 HPLC-ELSD 指纹图谱
Fig. 3 HPLC-ELSD Fingerprints of *Semen Ziziphi Spinosa* samples from different habitats

2.8 相似度分析^[5]:将实验数据导入中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004A 版软件,设定参照图谱,将谱峰自动匹配,然后生成对照图谱,进行相似度评价。由 10 批道地酸枣仁药材和对照药材生成酸枣仁药材指纹图谱的共有模式(即对照图谱),各样品与该共有模式比较,其相似度结果见表 2。

表 2 与共有模式比较的酸枣仁样品的相似度评价

Table 2 Evaluation of similarities among samples of *Semen Ziziphi Spinosae* compared with mutual model

样品号	相似度	样品号	相似度
1	0.963	12	0.970
2	0.989	13	0.985
3	0.937	14	0.970
4	0.993	15	0.927
5	0.987	16	0.976
6	0.988	17	0.986
7	0.996	18	0.966
8	0.968	19	0.830
9	0.967	20	0.966
10	0.987	21	0.919
11	0.985		

3 讨论

3.1 根据酸枣仁药材中化学成分的分类,一类是以皂苷类和黄酮类成分为主的高效液相指纹图谱,另一类是以脂肪油成分为主的气相指纹图谱,酸枣仁脂肪油成分的 GC-MS 指纹图谱研究另文发表。本实验主要研究了河北道地药材酸枣仁皂苷类成分的 HPLC-ELSD 指纹图谱,建立其共有模式,同时与不同产地酸枣仁药材进行了相似度比较,为河北道地药材酸枣仁的分析鉴定提供了新的科学方法和依据,为中药标准指纹谱库的建立和酸枣仁药材规范化种植提供研究基础。

3.2 根据指纹图谱相似度评价软件得出的结果表明,相似度在 0.90~1.00 为正品酸枣仁,药材品质较优,包括 10 批河北道地酸枣仁药材,而伪品云南理枣仁的相似度为 0.830。

3.3 比较 4 批生药材及其炒制品的指纹图谱发现,河北涉县(炒)和山西左权县(炒)均比其生药材多一个 45.8 min 的峰,说明炒制以后药材的化学成分有所变化。文献报道,酸枣仁生品和炒制品的药效不尽相同,可能与其化学成分发生变化有关。3 号(早期采)和 4 号(成熟期采)样品均产自河北承德宽城青龙,3 号相似度为 0.937,4 号为 0.993,有一定差距。同时早期采收药材的指纹图谱中各色谱峰峰高大大低于其他样品,说明不同的采收期的酸枣仁药材所含化学成分及其量有所变化,所以选用药材应固定产地和采收期,以确保药材的质量和疗效。

3.4 本试验选用蒸发光散射检测器 (ELSD) 进行色谱分析,ELSD 检测器对皂苷类成分的响应值较大,克服了皂苷类成分在 203 nm 有最大吸收但基线不稳、噪音较大的缺点。

3.5 在方法学研究中,直接应用中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2004A 版) 软件,通过计算相似度来比较精密度、稳定性和重现性,结果良好,比计算共有峰相对峰面积的 RSD 值更加方便快捷,更加客观地考察方法的各项效能指标,因为指纹图谱反映的是药材的“整体面貌”,而不单单是其中的几个色谱峰。

References:

- [1] Ch P (中国药典)[S]. Vol I, 2005.
- [2] Li H J, Li P. Determination of jujuboside A and jujuboside B in Spine Date Seed by HPLC-ELSD [J]. *Chin J Pharmaceut Anal* (药物分析杂志), 2000, 20(2): 82-84.
- [3] *Technical Requirement of the Fingerprint in Injection of Chinese Materia Medica (Tentative Standard)* (中药注射剂指纹图谱研究的技术要求(暂行)) [S]. 2001.
- [4] Xiao R, Yuan Z F, Wang C Y, et al. Studies on fingerprints of *Scutellaria baicalensis* from different producing areas with HPLC [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2005, 36(5): 743-747.
- [5] Xiao R, Zhang Z F, Yuan Z F, et al. Studies on HPLC-ELSD fingerprints of *Bupleuri chinense* DC. from Hebei Province [J]. *Chin J Pharmaceut Anal* (药物分析杂志), 2006, 26(2): 162-167.

欢迎订阅 2008 年《药学报》

《药学报》是由中国药学会主办、中国医学科学院中国协和医科大学药物研究所承办、国内外公开发行的药学综合性学术期刊。辟有栏目:述评和综述、研究论文、研究简报、学术动态。本刊自 1953 年创刊以来,一直报道药学领域原始性、创新性科研成果,旨在促进国内外学术交流。刊登论文内容包括药理学、合成药物化学、天然药物化学、药物分析学、药剂学、生药学等。本刊为 112 页,月刊,大 16 开本。每期定价 15 元,全年定价 180 元。国内邮发代码:2-233,国外代码:M105。

电话:(010) 63165208

传真:(010)63026192

编辑部地址:北京市先农坛街 1 号《药学报》编辑部

邮编:100050