

HPLC-MS 法同时测定酸枣仁中 9 种成分

张巧月, 杨浩天, 史 贺, 张智勇, 张兰桐*

河北医科大学药学院 药物分析教研室, 河北 石家庄 050017

摘要: 目的 建立 HPLC-MS/MS 法同时测定酸枣仁中酸枣仁皂苷 A、酸枣仁皂苷 B、斯皮诺素、白桦脂酸、白桦脂醇、芦丁、芹菜素、橙皮苷、柚皮苷的量。方法 采用 Sapphire C₁₈ 柱 (150 mm×4.6 mm, 5 μm), 以水 (1 mmol/L 乙酸铵-0.1% 的甲酸)-乙腈溶液为流动相进行梯度洗脱, 体积流量 1 mL/min, 进样量 10 μL, 柱温 30 °C; 采用电喷雾离子源进行负离子模式监测, 多反应监测模式 (MRM) 用于定量分析, 源喷射电压为-4 500 V, 离子源温度为 650 °C。结果 9 种成分的峰面积和质量浓度在测定质量浓度范围内均具有良好的线性关系, 加样回收率为 98.04%~101.5%, 精密度 RSD 值为 0.03%~0.74%。结论 本法简便、快速、灵敏度高、专属性好, 可用于酸枣仁中 9 种化学成分的测定。

关键词: 酸枣仁; HPLC-MS; 酸枣仁皂苷 A; 酸枣仁皂苷 B; 斯皮诺素; 白桦脂酸; 白桦脂醇; 芦丁; 芹菜素; 橙皮苷; 柚皮苷
中图分类号: R286.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2015)01-0123-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.01.024

Simultaneous quantification of nine constituents in *Ziziphi Spinosae Semen* by HPLC-MS

ZHANG Qiao-yue, YANG Hao-tian, SHI He, ZHANG Zhi-yong, ZHANG Lan-tong

Department of Pharmaceutical Analysis, School of Pharmacy, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China

Abstract: Objective To develop an HPLC-MS/MS method for the determination of jujuboside A, jujuboside B, spinosin, betulinic acid, betulin, rutin, apigenin, hesperidin, and naringin in *Ziziphi Spinosae Semen*. **Methods** Analysis was performed on a Sapphire C₁₈ column (150 mm × 4.6 mm, 5 μm) eluted with acetonitrile and 0.1% methanoic acid solution containing 1 mmol/L ammonium acetate in a gradient program. The flow rate was 1 mL/min, the injection volume was 10 μL, and the column temperature was 30 °C. The multiple-reaction monitoring scanning (MRM) was employed for the quantification with switching electrospray ion source polarity in negative mode. The ion spray voltage was set at -4 500 V and the turbo spray temperature was maintained at 650 °C. **Results** The regression equations showing linear relationships between peak areas and contents of each compound were obtained. The average recoveries of the compounds ranged from 98.04% to 101.5% and the precision in terms of RSD was in the range of 0.03%—0.74%. **Conclusion** The method is simple, rapid, and sensitive. It could be used as a quantitative determination method for the nine components in *Ziziphi Spinosae Semen*.

Key words: *Ziziphi Spinosae Semen*; HPLC-MS; jujuboside A; jujuboside B; spinosin; betulinic acid; betulin; rutin; apigenin; hesperidin; naringin

酸枣仁 *Ziziphi Spinosae Semen* 是《中国药典》2010 年版收载的养心安神药^[1], 属于卫生部颁布的第一批药食同源两用品, 其药用历史悠久,《神农本草经》列为上品,《本草纲目》列为本部类^[2]。酸枣仁味酸、性平, 具有补肝宁心、镇静安神、敛汗、生津等功效, 主要用于治疗虚烦不眠、惊悸多梦、体虚多汗、津伤口渴等症, 是河北省道地药材^[3]。

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^[4]。其中酸枣仁皂苷 A 和斯皮诺素是《中国药典》2010 年版所规定的酸枣仁的活性成分, 白桦脂酸也以其抗肿瘤活性备受关注。目前, 已有文献报道了一些酸枣仁活性成分 (酸枣仁皂苷 A、酸枣仁皂苷 B、斯皮诺素和白桦脂酸) 的测定分析方法, 包括高效液相色谱 (HPLC)^[5-7]、超高效液相色谱 (UPLC)^[8]

收稿日期: 2014-10-11

基金项目: 河北省自然科学基金-石药集团医药联合研究基金 (H2012206079)

作者简介: 张巧月 (1990—), 女, 硕士研究生, 从事中药质量控制与药理学研究。Tel: 15233656827 E-mail: 694910334@qq.com

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

和胶束毛细管电泳 (MEKC)^[9]等。但这些方法分析周期长, 所测成分单一, 因此, 为了进一步有效控制酸枣仁的质量, 提高临床用药的安全性, 需要建立一个可靠、准确的分析方法来对其多组分进行同时测定。

本研究建立了 HPLC-ESI-MS/MS 法同时测定酸枣仁药材中 9 种化学成分, 并将其应用于不同来源市售酸枣仁的质量分析, 可为酸枣仁药材的质量控制提供科学依据。

1 仪器与试剂

1.1 试剂

对照品酸枣仁皂苷 A (批号 110734-200510)、酸枣仁皂苷 B (批号 110814-200607)、芦丁 (批号 100080-200707) 均购自中国食品药品检定研究院 (质量分数均大于 98%); 斯皮诺素 (批号 121220) 购自成都普菲德生物技术有限公司 (质量分数大于 98%); 白桦脂酸 (批号 100904)、白桦脂醇 (批号 z120140326) 均购自南京泽朗医药科技有限公司 (质量分数均大于 98%); 芹菜素 (批号 101129) 购自上海融禾医药科技有限公司 (质量分数大于 98%); 柚皮苷 (批号 FY17910711)、橙皮苷 (批号 FY11290618) 均购自南京飞宇生物技术股份有限公司 (质量分数均大于 98%)。

乙腈为色谱纯 (美国 J. T. Baker 公司); 水为纯净水 (杭州娃哈哈集团有限公司); 甲酸为色谱纯 (美国 Dikma 公司); 其他试剂均为分析纯。酸枣仁 *Ziziphi Spinosae Semen* 取自不同产地酸枣 *Ziziphus jujuba* Mill. var. *spinosa* (Bunge) Hu ex H. F. Chou, 由河北医科大学药学院生药学李连怀副教授鉴定。样品具体信息见表 1。

1.2 仪器

Agilent1200 高效液相色谱仪, 配有在线脱气

表 1 酸枣仁样品

Table 1 Samples of *Ziziphi Spinosae Semen*

编号	代码	来源地
1	承德-1	河北承德
2	承德-2	河北承德
3	赞皇-1	河北赞皇
4	赞皇-2	河北赞皇
5	赞皇-3	河北赞皇
6	山西-1	山西
7	山西-2	山西
8	云南	云南

机, 四元泵, 自动进样器 (美国 Agilent 公司); 3200QTRAPTM 三重四级杆线性离子阱质谱仪, 配有 ESI 离子源 (美国 AB 公司); Analyst 1.5.2 software 数据系统 (美国 AB 公司); SCQ-200 超声波清洗器 (100 W, 25 kHz) (上海声谱超声波设备厂); BP211D 型十万分之一天平 (德国 Sartorius 公司)。

2 方法与结果

2.1 分析条件

2.1.1 色谱条件 色谱柱 Sapphire C₁₈ 柱 (150 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为水 (A, 1 mmol/L 乙酸铵-0.1%的甲酸)-乙腈 (B), 梯度洗脱 (0~2 min, 20%~95% B; 2~12 min, 95% B), 进样前按流动相初始条件平衡 6 min; 体积流量 1 mL/min; 柱温 30 °C; 进样量 10 μL。对照品和样品的提取多反应监测模式 (MRM) 色谱图见图 1。

2.1.2 质谱条件 离子源为电喷雾离子化源 (ESI); MRM 进行定量分析; 采用负离子检测模式; 源喷射电压 (IS) 为 -4 500 V; 离子源温度为 650 °C; 雾化气 (GS1, N₂) 压力为 413.70 kPa; 辅助气 (GS2, N₂) 压力为 448.18 kPa; 气帘气 (N₂) 压力为 206.85 kPa。接口加热, 全程通入氮气, MRM 模式定量。监测的离子对, 解簇电压 (DP) 和碰撞能量 (CE) 见表 2。9 种被测成分的二级质谱图见图 1。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备 分别称取对照品酸枣仁皂苷 A、酸枣仁皂苷 B、斯皮诺素、白桦脂酸、白桦脂醇、芦丁、芹菜素、橙皮苷、柚皮苷适量, 精密称定, 加 75% 甲醇制成对照品溶液。分别取各对照品溶液适量, 摇匀, 即得酸枣仁皂苷 A、酸枣仁皂苷 B、斯皮诺素、白桦脂酸、白桦脂醇、芦丁、芹菜素、橙皮苷、柚皮苷的混合对照品溶液, 质量浓度分别为 12.000、25.000、5.313、175.000、327.500、95.000、0.231、80.000、0.375 μg/mL。

2.2.2 供试品溶液的制备 将洁净酸枣仁于 40 °C 条件下干燥 8 h, 研磨后过 40 目筛。取酸枣仁粉末约 5 g, 置于索氏提取器中, 用石油醚 (60~90 °C) 浸泡过夜 (8 h), 脱脂 2 次, 每次 2 h, 回收石油醚。将脱脂粉末挥尽残醚至无醚味, 精密称取 1 g 酸枣仁脱脂粉, 转移至 25 mL 具塞三角瓶中, 精密加入 75% 甲醇 20 mL, 称质量, 冰浴超声 1 h, 再称质量, 用 75% 甲醇补足缺失的质量, 取上清液, 用 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液作为供试品溶液。

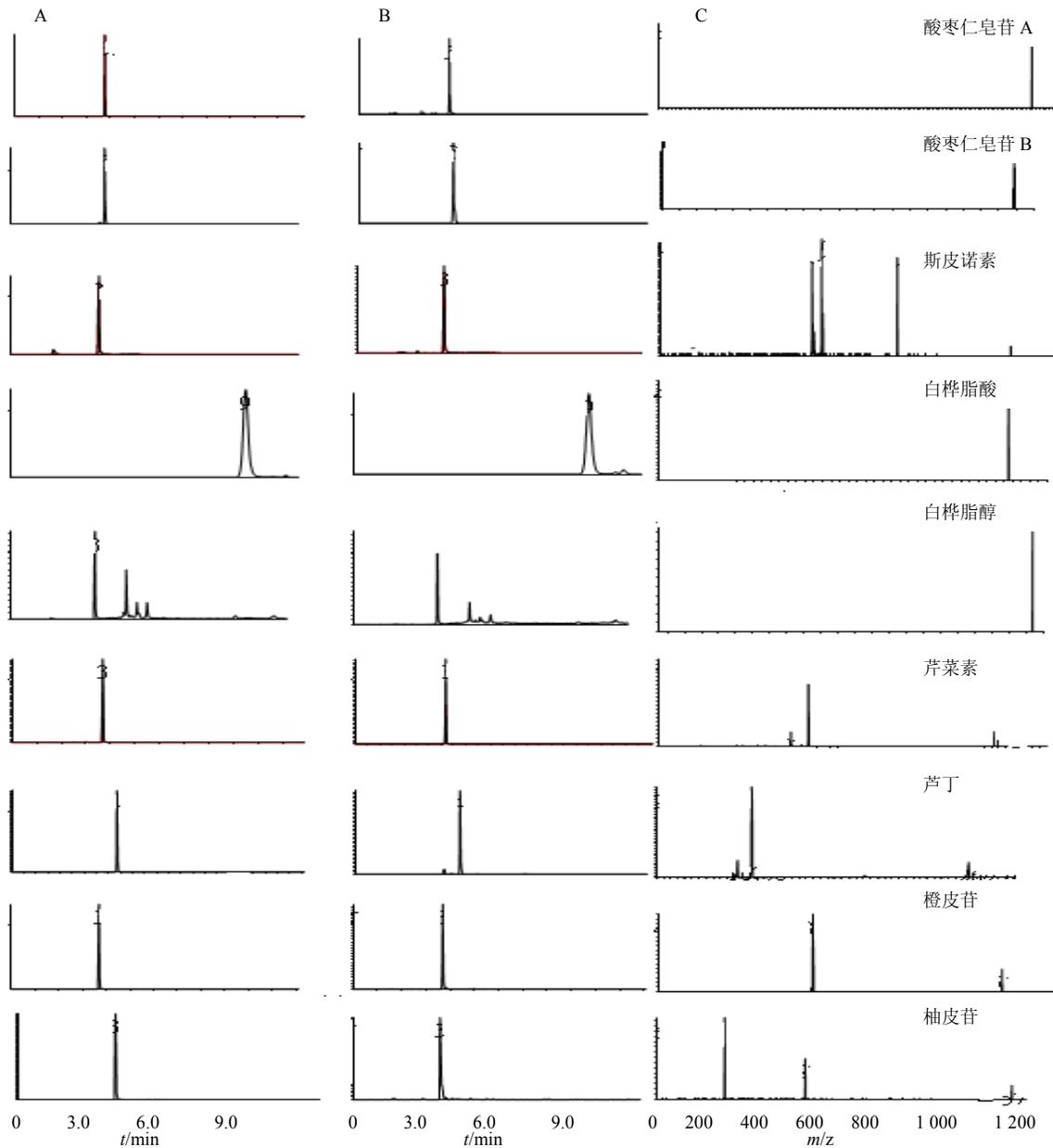


图 1 对照品 (A)、酸枣仁样品 (B) 的多重反应监测色谱图 and 对照品二级质谱图 (C)

Fig. 1 MRM chromatograms of reference substances (A) and *Semen Ziziphi Spinosa* samples (B) and second mass spectrum of reference substances (C)

表 2 酸枣仁中 9 种成分的质谱数据

Table 2 HPLC-ESI-MSⁿ data of nine constituents from *Ziziphi Spinosa* Semen

成分	相对分子质量	t_R /min	离子源模式	MS ¹ (m/z)	MS ² (m/z)	DP/V	CE/eV
酸枣仁皂苷 A	1 207.35	3.76	ESI ⁻	1 206.2	1 206.2	-91	-27
酸枣仁皂苷 B	1 045.21	3.93	ESI ⁻	1 043.4	1 043.4	-134	-24
斯皮诺素	608.54	3.69	ESI ⁻	607.3	292.0	-122	-70
白桦脂酸	456.71	9.87	ESI ⁻	455.3	455.3	-97	-20
白桦脂醇	442.72	3.69	ESI ⁻	487.4	487.4	-58	-13
芹菜素	270.24	4.35	ESI ⁻	260.0	116.8	-80	-51
芦丁	610.51	3.69	ESI ⁻	609.0	300.0	-95	-49
橙皮苷	610.56	3.69	ESI ⁻	610.2	301.3	-74	-36
柚皮苷	580.53	3.68	ESI ⁻	579.2	150.8	-92	-56

2.3 方法学考察

2.3.1 线性关系、定量限和检测限 精密量取上述混合对照品溶液适量, 采用倍数稀释法进行稀释, 得到 6 个不同质量浓度的系列对照溶液, 按照上述色谱和质谱条件进行分析, 并记录色谱峰面积。以对照品的质量浓度为横坐标 (X), 峰面积为纵坐标 (Y), 绘制标准曲线, 并进行线性回归, 得标准曲线方程 (表 3)。将混合对照品溶液逐步稀释并进行测定, 分别以信噪比为 10 和 3 时各对照品的量作为定量限 (LOQ) 和检测限 (LOD)。结果 9 种待测组分的质量浓度和峰面积的相关系数 (r) 均大于 0.998 4,

表明该方法的线性关系良好, 各组分的回归方程、线性范围、检测限 (LOQ) 和定量限 (LOD) 见表 3。

2.3.2 精密度的试验 取同一批号 (赞皇-3) 酸枣仁样品, 取约 1 g, 精密称取 6 份, 按“2.2.2”项下操作, 制备供试品溶液, 在“2.1”色谱条件下记录 9 种化合物的峰面积, 计算 RSD 值, 考察日内精密度的。取同一批号 (赞皇-3) 酸枣仁样品, 取约 1 g, 精密称取 6 份, 按“2.2.2”项下操作, 制备供试品溶液, 在上述色谱条件下记录 9 种待测成分的峰面积, 连续 3 d 测定计算 RSD 值, 考察日间精密度的。结果显示日内精密度的 RSD 值分别小于 0.38%

表 3 9 种成分的回归方程、相关系数、线性范围、定量限和检测限

Table 3 Regression equations, correlation coefficients, linear ranges, LODs, and LOQs of nine constituents

成分	标准曲线方程	r	线性范围/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	LOD/ $(\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1})$	LOQ/ $(\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1})$
酸枣仁皂苷 A	$Y=476.37 X+7.965 2$	0.999 7	0.375~12.00	86.600 0	350.630 0
酸枣仁皂苷 B	$Y=353.86 X-81.920$	0.999 6	0.781~25.00	104.690 0	318.800 0
斯皮诺素	$Y=74 838 X+66 546$	0.998 4	0.166~5.313	0.734 4	2.447 9
白桦脂酸	$Y=245 066 X+5 000 000$	0.998 7	5.469~175.0	5.469 0	10.940 0
白桦脂醇	$Y=248.21 X+24 711$	0.998 4	20.47~655.0	843.750 0	2 109.4
芹菜素	$Y=253 404 X-623.01$	0.999 0	0.007~0.231	0.104 6	1.156 3
芦丁	$Y=6 779.3 X+359.2$	0.999 7	0.578~18.50	0.115 6	0.385 4
橙皮苷	$Y=8 012.3 X-1 207.4$	0.999 6	0.156~10.00	12.500 0	31.250 0
柚皮苷	$Y=14 562 X+65.046$	0.998 7	0.012~0.375	0.031 3	0.093 8

和 0.47%, 表明该方法精密度良好。

2.3.3 加样回收率试验 精密称取已测定的酸枣仁样品 0.5 g, 分别精密加入高、中、低 3 个水平的对照品溶液, 每个水平 3 份, 共 9 份, 按“2.2.2”项下方法操作, 制备供试品溶液。按上述的色谱条件测定 9 个化合物的峰面积, 计算回收率及 RSD 值。结果 9 种被测成分的平均回收率为 98.04%~101.5%, RSD 值为 0.03%~0.74%。

2.3.4 稳定性试验 取同一供试品溶液 (赞皇-3), 分别于 0、2、4、8、12、24 h 进样分析测定, 记录峰面积, 考察供试品溶液的稳定性。结果表明所有被测物峰面积的 RSD<0.42%, 说明样品稳定性良好。

2.3.5 重复性试验 取同一批号 (赞皇-3) 酸枣仁样品, 取约 1 g, 精密称取 6 份, 按“2.2.2”项下操作, 制备供试品溶液, 在“2.1”色谱条件下记录 9 种化合物的峰面积, 计算 RSD 值, 考察重复性。9 种化合物的 RSD 值均小于 0.38%, 符合规定, 表明本方法重复性良好。

2.4 样品测定

取不同批次的酸枣仁样品, 按“2.2.2”项下的方法制备供试品溶液, 按照“2.1”项下的条件进行测定, 记录色谱峰面积, 将 9 个待测成分的峰面积代入相应的标准曲线方程中, 并计算其质量分数。不同批号的酸枣仁的测定结果见表 4。

8 批酸枣仁中 9 种成分的总量在 45.00~215.14 $\mu\text{g/g}$, 表明这 9 种成分在不同产地不同批次的酸枣仁中的总量有明显的不同, 样品 4、5 和 3 的总量最高, 分别是 215.14、210.12、203.32 $\mu\text{g/g}$, 样品 1 和 2 的总量次之, 为 193.54 和 182.45 $\mu\text{g/g}$, 而样品 8 (伪品滇枣仁) 量最低, 为 45.00 $\mu\text{g/g}$ 。7 批正品酸枣仁的平均量是 177.3 $\mu\text{g/g}$ 。平均质量分数最高的成分是白桦脂酸 97.30 $\mu\text{g/g}$, 接着是白桦脂醇 53.57 $\mu\text{g/g}$, 芦丁 10.86 $\mu\text{g/g}$, 酸枣仁皂苷 B 6.80 $\mu\text{g/g}$ 。芹菜素、橙皮苷和柚皮苷是平均量较低的成分, 而柚皮苷在伪品滇枣仁中没有检测到。从整体来看, 河北赞皇的酸枣仁有效成分量高, 河北承德次之, 山西第三, 伪品酸枣仁量最低。这些分析结

表4 酸枣仁中9种成分的测定结果

Table 4 Determination of nine constituents in *Ziziphi Spinosae Semen*

样品 编号	质量分数/($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)								
	酸枣仁皂苷 A	酸枣仁皂苷 B	斯皮诺素	白桦脂酸	白桦脂醇	芹菜素	芦丁	橙皮苷	柚皮苷
1	4.83	8.85	1.42	120.78	54.93	0.23	1.73	0.45	0.32
2	3.88	10.91	1.36	108.11	55.73	0.14	1.56	0.38	0.38
3	3.82	4.89	1.65	109.92	68.82	0.07	12.44	1.30	0.41
4	4.77	6.25	1.65	116.30	67.24	0.08	16.76	1.70	0.39
5	5.08	6.73	1.75	115.80	65.27	0.07	13.64	1.44	0.34
6	3.99	5.40	1.50	56.72	32.04	5.40	15.14	1.50	0.09
7	3.10	4.54	1.62	53.48	30.96	4.89	14.72	1.43	0.11
8	2.05	4.05	0.78	29.38	6.89	0.05	1.48	0.32	未检测到

果表明不同产地甚至是相同产地不同批次的酸枣仁中9种待测物的量存在着很大差异。

3 讨论

本实验首次建立了一种快速、准确的 HPLC-MS/MS 分析方法,用于同时测定酸枣仁中的9种化合物(酸枣仁皂苷 A、酸枣仁皂苷 B、斯皮诺素、白桦脂酸、白桦脂醇、芦丁、芹菜素、橙皮苷、柚皮苷)。该方法成功检测了市售常见的8批酸枣仁样品,结果表明不同产地或是相同产地不同批次的酸枣仁9种成分的量存在着差异。HPLC-MS/MS 方法为酸枣仁的质量控制提供了可靠地分析手段。

实验比较了以50%、75%、90%、100%甲醇,75%乙醇,纯乙醇为提取媒介,提取供试品,结果表明以75%甲醇提取效率较高。之后比较了超声提取及加热回流提取效果,2种方式提取率相近,由于超声提取相对方便快捷,因此选择超声提取法。此外还考察了提取30、45、60、90 min对待测成分的提取效果,结果表明超声提取60 min,提取效率较高。

流动相的选择,分别以甲醇-水、乙腈-水作为流动相进行梯度洗脱,结果表明以乙腈-水为流动相进行梯度洗脱时9种待测物均有很好的分离,所以选择乙腈为流动相。为改善峰形,比较了乙腈-甲酸(0.05%、0.1%、0.2%和0.3%)为流动相时的分离效果,结果显示乙腈-0.1%甲酸水峰形较好。为了提高皂苷类化合物在质谱中的离子稳定性,在流动相

中加入了乙酸铵(0.5、1、2、3 mmol/L),结果显示流动相为水(1 mmol/L 乙酸铵-0.1%的甲酸)-乙腈时,峰形更好。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2010
- [2] 史琪荣, 周耘, 周萍, 等. 中药酸枣仁的研究概况 [J]. 天然药物化学, 2004, 22(2): 94-97.
- [3] 张志斐, 袁志芳, 张兰桐, 等. 河北道地药材酸枣仁 HPLC-ELSD 指纹图谱研究 [J]. 中草药, 2006, 37(8): 1247-1250.
- [4] 闫艳, 杜晨晖, 李小菊, 等. 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 [J]. 药物分析杂志, 2011, 31(1): 30-33.
- [5] Zhang M C, Zhang Y Q, Xie J B. Simultaneous determination of jujuboside A, B and betulinic acid in *Semen Ziziphi Spinosae* by high performance liquid chromatography-evaporative light scattering detection [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2008, 48(5): 1467-1470.
- [6] 吴闯, 张健, 殷志琦. HPLC 测定酸枣仁中白桦脂酸的含量 [J]. 药物生物技术, 2010, 17(3): 244-246.
- [7] 张翠英, 刘峰, 郭丽丽, 等. 酸枣仁醇提物中4个活性成分的测定 [J]. 中成药, 2011, 33(12): 2119-2121.
- [8] 崔思娇, 罗洁, 张靓琦, 等. UPLC 同时测定酸枣仁中4种活性成分的含量 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2013, 15(6): 1323-1327.
- [9] Dong M, Chen G H, Wu X, et al. Determination of jujuboside A and B by micellar electrokinetic capillary chromatography [J]. *Chin J Nat Med*, 2010, 8(3): 208-211.