

快速溶剂萃取-电雾式检测器同时测定酸枣仁中 4 种成分

陈学松¹, 张杨刚²

1. 广西壮族自治区梧州食品药品检验所, 广西 梧州 543002

2. 赛默飞世尔科技(中国)有限公司, 上海 201206

摘要: **目的** 建立一种快速溶剂萃取(ASE)-电雾式检测器(CAD)同时测定酸枣仁中酸枣仁皂苷 A、酸枣仁皂苷 B、斯皮诺素、白桦脂酸的方法。**方法** 采用正交试验对快速溶剂萃取系统的提取条件进行优化, 并用电雾式检测器对酸枣仁中目标成分进行同时检测。色谱柱为 Thermo Synchronis C₁₈ (100 mm×3 mm, 3 μm), 流动相为乙腈-水, 体积流量为 0.5 mL/min, 柱温为 40 °C, Corona Ultra 电雾式检测器, 雾化温度 35 °C。**结果** 优化了 ASE 参数, 极大地提高了提取效率, 通过 1 次进样, 同时测定酸枣仁中酸枣仁皂苷 A、酸枣仁皂苷 B、斯皮诺素、白桦脂酸的量, 线性关系良好, 相关系数为 0.998 3~0.999 6, 加样回收率在 98.46%~102.02%。**结论** 该方法快速、简便、准确可靠, 可用于酸枣仁药材的质量控制。

关键词: 快速溶剂萃取; 电雾式检测器; 酸枣仁; 酸枣仁皂苷 A; 酸枣仁皂苷 B; 斯皮诺素; 白桦脂酸

中图分类号: R286.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2017)10-2002-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.10.012

Simultaneous determination of four constituents in *Zizyphi Spinosae Semen* by ASE-CAD

CHEN Xue-song¹, ZHANG Yang-gang²

1. Wuzhou Institute for Food and Drug Control, Wuzhou 543002, China

2. Thermo Fisher Scientific Corporation, Shanghai 201206, China

Abstract: Objective To establish an accelerated solvent extraction (ASE)-charged aerosol detector (CAD) method for simultaneous detection of jujuboside A, jujuboside B, spinosin, and betulinic acid in *Zizyphi Spinosae Semen*. **Methods** The orthogonal design was applied to optimize the extraction parameters of the ASE system. The target compounds were detected by HPLC-CAD with the parameters as follow: Thermo Synchronis C₁₈ (100 mm × 3 mm, 3 μm) column, a gradient elution program with acetonitrile-water as mobile phase at a flow rate of 0.5 mL/min, the column temperature was kept at 40 °C. Detector was Corona Ultra CAD with 35 °C of nebulization temperature. **Results** Optimization of the ASE parameters with orthogonal design greatly improved the extraction efficiency; All the target compounds could be simultaneously determined in a single run. Good linear relationships (0.998 3—0.999 6) and high relative recoveries were 98.46%—102.02%. **Conclusion** The method is rapid, simple, accurate, and thus could be used for the quality control of *Zizyphi Spinosae Semen*.

Key words: accelerated solvent extraction; charged aerosol detector; *Zizyphi Spinosae Semen*; jujuboside A; jujuboside B; spinosin; betulinic acid

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。具养心补肝、宁心安神、敛汗、生津之功效, 常用于虚烦不眠、惊悸多梦、体虚多汗、津伤口渴^[1]。其主要的有效化学成分^[2]为三萜皂苷类、黄酮类、三萜类、生物碱等。酸枣仁具有镇静催眠、抗焦虑、抗惊厥、抗炎、抗肿瘤等作用^[3]。《中国药

典》2015 年版一部酸枣仁测定的提取方法为传统索氏提取法, 该方法操作繁琐、耗时长; 快速溶剂萃取(ASE)是指在密闭容器内于高温(50~200 °C)和高压(3 448~20 689 kPa)条件下, 在短时间内用有机溶剂提取固体或半固体样品的一种新型样品前处理方法^[4]。与超声、微波、回流、超临界萃取等成熟方法相比, ASE 有萃取溶剂用量少、提取时

收稿日期: 2017-05-01

作者简介: 陈学松(1973—), 男, 本科, 研究方向为食品、药品质量控制与监管。E-mail: 85371400@qq.com

间短、萃取效率高、操作简单方便、安全和自动化程度高等优点^[5-9]。国外已有学者将这项技术应用于植物药定量和定性分析中样品的前处理,但在中药材有效成分的定量和定性分析中作为样品的前处理方法应用较少^[10],本研究尝试将其应用到酸枣仁有效成分测定中,以避免传统方法的上述缺陷。

电雾式检测器(CAD)是一款新型的通用型检测器,它基于雾化检测器的原理,洗脱液经雾化后形成颗粒,经过漂移管干燥后与带电氮气碰撞,使得目标化合物带上正电荷,最后通过静电计测量电荷的量,该测量值与目标化合物的质量成一定比例关系,其响应不依赖于化合物的分子结构,能对大多数化合物提供一致响应性,同时能达到较高的灵敏度和低检测极限、重现性、稳定性较好,因此能准确地用于定量分析。对于酸枣仁中有效成分的测定,传统方法多采用液相二极管阵列检测器、蒸发光检测器和液相质谱检测系统^[11-14],然而酸枣仁皂苷 A、B 与白桦脂酸为三萜皂苷类成分,紫外吸收差,使用二极管阵列检测器灵敏度低,而蒸发光散色检测器(ELSD)检测基线不够稳定、灵敏度也难以满足要求;液相质谱检测系统虽然灵敏度较高,但是仪器价格高、操作复杂、维护不易。电雾式检测器是一种基于质量的灵敏检测器,尤其适于测定与化学特性无关的任何不挥发分析物,该技术的灵敏度和精度比蒸发光散射检测的高、重复性好,可达到纳克级灵敏度,因此使用电雾式检测器进行酸枣仁中多种有效成分的检测,具有很大的实际应用前景。

本研究采用快速溶剂萃取法结合 CAD,建立了同时测定酸枣仁中酸枣仁皂苷 A、酸枣仁皂苷 B、斯皮诺素、白桦脂酸量的方法,该方法高效准确、重现性好。

1 仪器与试药

1.1 仪器

ThermoFisher SCITIFIC ULTIMATE 3000 高效液相色谱仪配置电雾式检测器 Corona Ultra(赛默飞世尔科技公司)、ASE350 快速溶剂萃取仪(赛默飞世尔科技公司)、XA205DU 电子分析天平(梅特勒仪器有限公司),超纯水机(默克密理博公司),EV311-V 旋转蒸发仪(北京莱伯泰科科技有限公司)。

1.2 试药

对照品酸枣仁皂苷 A(批号 110734-201512,

质量分数 95.6%)、酸枣仁皂苷 B(批号 110814-200506,质量分数 100%)、斯皮诺素(批号 111869-201203,质量分数 95.4%)、白桦脂酸(批号 111802-201001,质量分数 100%)均由中国食品药品检定研究院提供;乙腈为色谱级,其余试剂均为分析纯。

酸枣仁均为市售品(批号 1508015、1511018,产地河北;批号 150401 产地山东;批号 150802、151110,产地江西;批号 1511003、151008、151112,产地山东;批号 1508003、151003,产地云南),经广西梧州食品药品检验所黄衡副主任中药师鉴定为鼠李科植物酸枣 *Ziziphus jujuba* Mill. var. *spinosa* (Bunge) Hu ex H. F. Chou 的干燥成熟种子。

2 方法

2.1 对照品储备液的制备

分别精密称取酸枣仁皂苷 A、酸枣仁皂苷 B、斯皮诺素、白桦脂酸对照品适量,加甲醇溶解并定容至刻度,制成质量浓度分别为酸枣仁皂苷 A 4.180 2 mg/mL、酸枣仁皂苷 B 5.088 0 mg/mL、斯皮诺素 4.730 4 mg/mL、白桦脂酸 4.272 0 mg/mL 的对照品储备液,于冰箱中保存,备用。

2.2 供试品溶液的制备

取本品粉末(过 4 号筛)约 1 g,精密称定,与约 1 g 硅藻土混合均匀填充于 10 mL 萃取池,按 ASE 正交设计优化的条件进行先除杂再提取,除杂过程:用正己烷在 80 °C 静态萃取 8 min,循环萃取 1 次,萃取液弃去并氮气吹扫 300 s;提取过程:萃取溶剂为甲醇,萃取温度 100 °C,静态萃取时间 8 min,萃取循环次数为 1 次,冲洗体积 60%,氮气吹扫时间为 60 s。得到约 25 mL 萃取液回收溶剂至干,残渣加甲醇溶解,转移至 5 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.3 色谱条件

色谱柱 Thermo Synchronis C₁₈(100 mm×3 mm, 3 μm, 美国赛默飞世尔科技公司),流动相为乙腈-水,梯度洗脱程序为 0~8 min, 10%~60%乙腈; 8~10 min, 60%~80%乙腈; 10~13 min, 80%~100%乙腈; 13~16 min, 100%乙腈; 体积流量 0.5 mL/min, 柱温 40 °C, 雾化温度 35 °C, 进样量 1 μL。各成分色谱峰计算的理论塔板数均≥4 000。见图 1。

2.4 线性关系考察

分别精密量取对照品储备液 0.4、0.8、1.2、1.6、2.0 mL 至 10 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,配制成一

系列线性质量浓度, 进样量为 1 μL , 在上述色谱条件下测定其峰面积, 以各成分进样量为横坐标 (X), 峰面积为纵坐标 (Y), 绘制标准曲线, 得回归方程及相关系数, 结果表明 4 种成分在 0.2~1.0 μg 内与峰面积呈良好线性关系, 见表 1。

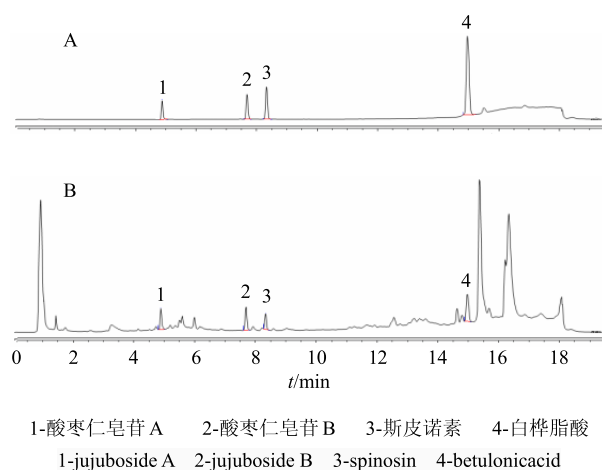


图 1 混合对照品 (A) 和酸枣仁样品 (B) 的 HPLC 图
Fig. 1 HPLC spectrogram of reference substances (A) and sample (B)

表 1 酸枣仁中 4 种成分回归方程和线性范围

Table 1 Regression equations and linear ranges of four active analytes

成分	回归方程	r	线性范围/ μg
酸枣仁皂苷 A	$Y=1.1941X+0.0840$	0.998 3	0.167 2~0.836 0
酸枣仁皂苷 B	$Y=1.8435X+0.1235$	0.999 6	0.203 5~1.017 6
斯皮诺素	$Y=2.3946X+0.1482$	0.999 2	0.189 2~0.946 1
白桦脂酸	$Y=8.5365X+0.5477$	0.999 0	0.170 9~0.854 4

2.5 精密度试验

取混合对照品溶液, 连续进样 6 次, 记录峰面积, 酸枣仁皂苷 A、酸枣仁皂苷 B、斯皮诺素、白桦脂酸峰面积的 RSD 依次为 0.15%、0.41%、0.30%、0.23%, 表明仪器精密度良好。

2.6 重复性试验

取酸枣仁样品 (批号 1508015), 按“2.2”项下方法制备 6 份供试品溶液, 按上述色谱条件进行测定, 计算酸枣仁皂苷 A、酸枣仁皂苷 B、斯皮诺素、白桦脂酸量分别为 3.39、2.86、1.63、1.07 mg/g, RSD 依次为 0.72%、1.02%、0.87%、0.51%, 表明方法重复性良好。

2.7 稳定性试验

取重复性试验供试品溶液, 分别于 0、4、8、

12、16、20、24 h 进样, 记录峰面积, 计算酸枣仁皂苷 A、酸枣仁皂苷 B、斯皮诺素、白桦脂酸峰面积的 RSD 依次为 0.38%、0.92%、0.43%、0.57%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.8 加样回收率试验

取已测定的酸枣仁样品 (批号 1508015) 6 份, 每份 1 g, 精密称定, 精密加入酸枣仁皂苷 A、酸枣仁皂苷 B、斯皮诺素、白桦脂酸对照品储备液适量, 按“2.2”项下方法制备供试品溶液, 在上述色谱条件进行测定, 分别计算酸枣仁皂苷 A、酸枣仁皂苷 B、斯皮诺素、白桦脂酸的平均回收率依次为 102.02%、98.46%、101.16%、100.93%, RSD 依次为 1.82%、1.07%、1.93%、1.17%, 表明该方法的准确度良好。

2.9 检出限和定量限的测定

取对照品溶液逐级稀释, 测定酸枣仁皂苷 A、酸枣仁皂苷 B、斯皮诺素、白桦脂酸峰高, 分别以信噪比 (S/N) 等于 3 和 10 为标准, 测得 4 个待测成分的检出限和定量限, 本试验方法检出限酸枣仁皂苷 A 为 0.7 $\mu\text{g/mL}$ 、酸枣仁皂苷 B 0.8 $\mu\text{g/mL}$ 、斯皮诺素 0.8 $\mu\text{g/mL}$ 、白桦脂酸 0.7 $\mu\text{g/mL}$; 定量限酸枣仁皂苷 A 为 2.4 $\mu\text{g/mL}$ 、酸枣仁皂苷 B 2.6 $\mu\text{g/mL}$ 、斯皮诺素 2.6 $\mu\text{g/mL}$ 、白桦脂酸 2.4 $\mu\text{g/mL}$ 。

3 结果与分析

3.1 ASE 正交试验及结果分析

3.1.1 除杂溶剂和萃取溶剂的选择 《中国药典》2015 年版采用石油醚作为除杂溶剂, 本实验同时考察了石油醚、正己烷的除杂效果, 通过 HPLC-CAD 检测对杂质峰高和数量进行比较, 确定选择正己烷为除杂溶剂。

根据待测成分的溶解性考察了甲醇、70%乙醇作为萃取溶剂, 结果显示甲醇与 70%乙醇提取斯皮诺素含量一致, 且杂质峰基本相同, 考虑到甲醇更易于浓缩蒸干, 故采用甲醇提取溶剂。

3.1.2 ASE 萃取条件正交试验的设计和样品测定 以酸枣仁皂苷 A、酸枣仁皂苷 B、斯皮诺素、白桦脂酸的萃取量以及 4 种成分的萃取总量为考察指标, 在单因素实验中对萃取温度 (60~180 $^{\circ}\text{C}$)、冲洗体积分数 (60%~100%)、静态萃取时间 (5~10 min) 和循环次数 (1~5 次) 进行初步筛选, 确定冲洗体积为 60%, 进一步优化的萃取温度范围为 80~120 $^{\circ}\text{C}$, 静态萃取时间为 6~10 min, 循环次数为 1~3 次。采用 $L_9(3^3)$ 正交设计表优化, 各试验条件下重复 2 次。因素水平正交试验设计见表 2, 正交试

表 2 $L_9(3^3)$ 正交试验设计
Table 2 $L_9(3^3)$ Orthogonal experimental design

水平	因素		
	A/℃	B/min	C/次
1	80	6	1
2	100	8	2
3	120	10	3

验结果分析见表 3。由正交试验结果可见, 从各指标成分的极差来看, 影响萃取效率由大到小依次是温度 (A)、静态萃取时间 (B)、循环次数 (C)。综合指标成分的萃取效率及考虑节约溶剂和时间, 最终选择 ASE 的萃取条件为萃取温度 100 ℃, 静态萃取时间 8 min, 循环萃取 1 次。

3.2 不同提取方法的比较

取不同批次的酸枣仁粉末 1 g, 精密称定, 分别

表 3 正交试验结果
Table 3 Analysis of orthogonal test results

指标成分	试验号	A	B	C	质量分数/(mg·g ⁻¹)				
					斯皮诺素	酸枣仁皂苷 A	酸枣仁皂苷 B	白桦脂酸	4 种成分总量
斯皮诺素	1	1	1	1	3.364	2.828	1.595	0.87	8.657
	2	1	2	3	3.372	2.832	1.601	0.94	8.745
	3	1	3	2	3.368	2.83	1.598	1.06	8.856
	4	2	1	3	3.388	2.847	1.617	1.073	8.925
	5	2	2	2	3.391	2.859	1.627	1.108	8.985
	6	2	3	1	3.393	2.858	1.628	1.076	8.955
	7	3	1	2	3.374	2.834	1.602	0.986	8.796
	8	3	2	1	3.386	2.844	1.611	1.112	8.953
	9	3	3	3	3.384	2.846	1.615	1.031	8.876
斯皮诺素	k_1	3.368	3.375	3.381					
	k_2	3.391	3.383	3.378					
	k_3	3.381	3.382	3.381					
	R	0.023	0.008	0.004					
酸枣仁皂苷 A	k_1	2.830	2.836	2.843					
	k_2	2.855	2.845	2.841					
	k_3	2.841	2.845	2.842					
	R	0.025	0.009	0.002					
酸枣仁皂苷 B	k_1	1.598	1.605	1.611					
	k_2	1.624	1.613	1.609					
	k_3	1.609	1.614	1.611					
	R	0.026	0.009	0.002					
白桦脂酸	k_1	0.957	0.976	1.019					
	k_2	1.086	1.053	1.051					
	k_3	1.043	1.056	1.015					
	R	0.129	0.079	0.037					
4 种成分总量	k_1	8.753	8.793	8.855					
	k_2	8.955	8.894	8.879					
	k_3	8.875	8.896	8.849					
	R	0.202	0.103	0.030					

按“2.2”项下以及《中国药典》2015 版一部酸枣仁项下方法制备供试品溶液, 分别按各自方法色谱条件下进行分析测定, 取 2 种方法得到的定量结果进行 t 检验, 根据 t 值表, 所得 t 值 $< t(df) 0.05 = 1.833$,

即 2 种方法的统计学差异不显著, 结果见表 4。

4 讨论

本研究采用 ASE 法进行酸枣仁中有效成分的提取, 以酸枣仁皂苷 A、酸枣仁皂苷 B、斯皮诺素、白

表 4 10 批样品不同提取方法的质量分数比较

Table 4 Comparison of different extraction methods for 10 batches of samples

批号	斯皮诺素/%			酸枣仁皂苷 A/%			酸枣仁皂苷 B/%			白桦脂酸/%			4 种成分总量/%		
	药典	ASE	RSD	药典	ASE	RSD	药典	ASE	RSD	药典	ASE	RSD	药典	ASE	RSD
1508015	3.398	3.391	0.1	2.825	2.859	0.8	1.611	1.627	0.7	1.031	1.068	2.5	8.865	8.945	0.6
1511018	2.638	2.651	0.3	1.218	1.225	0.4	0.901	0.928	2.1	0.542	0.527	2.0	5.299	5.331	0.4
150401	1.211	1.228	1.0	0.887	0.865	1.8	1.033	1.042	0.6	0.862	0.885	1.9	3.993	4.020	0.5
150802	1.685	1.673	0.5	0.955	0.992	2.7	1.247	1.225	1.3	0.708	0.719	1.1	4.595	4.609	0.2
151110	0.988	0.995	0.5	1.528	1.542	0.6	1.048	1.006	2.9	0.983	0.962	1.5	4.547	4.505	0.7
1511003	1.479	1.492	0.6	1.647	1.639	0.3	0.835	0.843	0.7	1.069	1.116	3.0	5.030	5.090	0.8
151008	1.391	1.382	0.5	2.066	2.044	0.8	0.653	0.662	1.0	0.912	0.897	1.2	5.022	4.985	0.5
151112	1.011	1.004	0.5	0.725	0.736	1.1	1.022	1.038	1.1	0.671	0.692	2.2	3.429	3.470	0.8
1508003	1.901	1.925	0.9	1.869	1.882	0.5	1.281	1.263	1.0	1.228	1.194	2.0	6.279	6.264	0.2
151003	2.789	2.783	0.2	1.372	1.385	0.7	1.528	1.542	0.6	0.859	0.874	1.2	6.548	6.584	0.4
t 值	0.993			0.979			0.990			0.941			0.978		

桦脂酸的萃取量以及 4 种成分的萃取总量为指标, 采用 $L_9(3^3)$ 正交试验优化萃取温度、静态萃取时间和循环次数等 ASE 的主要影响因素, 与《中国药典》传统方法相比, 除杂和提取过程能在 1 h 内完成, 大大缩短了样品前处理时间。2 种提取方法测得的各分量基本一致, ASE 法操作方便, 安全性好、自动化程度高并且环保。

CAD 为通用型检测器, 其检测信号对不同结构的化合物有一致的响应, 研究显示, 酸枣仁有效成分标准曲线在较小范围内, CAD 检测器的响应值与化合物质量呈直线关系, 可采用外标两点法计算, 比较方便。与药典方法中蒸发光检测器 (ELSD) 相比 (检测限约为 20 $\mu\text{g/mL}$), 灵敏度更高, 基线更稳定, 利于定量分析。目前对酸枣仁的质量研究只是局限于仅对酸枣仁皂苷类或斯皮诺素进行研究, 本实验建立的 ASE-HPLC-CAD 方法能够同时测定酸枣仁中酸枣仁皂苷 A、酸枣仁皂苷 B、斯皮诺素、白桦脂酸量, 拓展了酸枣仁质量研究的应用范围。该方法简便、快速、准确, 可实现对酸枣仁多组分的质量控制, 为 ASE 延伸到中药的提取提供了理论基础; 同时也可利用 CAD 特性, 尝试开发酸枣仁及其类似药材的一测多评方法, 用于全面评价和分析药材的质量。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] 马进杰, 刘 萍, 马百平. 酸枣仁化学成分及其镇静催眠作用研究进展 [J]. 国际药学研究杂志, 2011, 38(3): 206-211.
- [3] 陈 雯, 黄世敬. 酸枣仁化学成分及药理作用研究进展 [J]. 时珍国医国药, 2011, 22(7): 1726-1728.

- [4] Richter B E, Jones B A, Ezzell J L, *et al.* Accelerated solvent extraction: A technique for sample preparation [J]. *Anal Chem*, 1996, 68(6): 1033-1039.
- [5] 牟世芬, 刘勇建. 加速溶剂萃取的原理及应用 [J]. 现代科学仪器, 2001, 1(3): 299-300.
- [6] 黄忠良, 蒋利华, 熊远福, 等. 植物功能成分提取技术研究进展 [J]. 河南化工, 2009, 26(12): 17-20.
- [7] Wong L J, Curtis L W. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants [J]. *Trends Food Sci Technol*, 2006, 17(6): 300-306.
- [8] Billa N, Hubin-barrows D, Lahren T, *et al.* Evaluation of microcolorimetric lipid determination method with samples prepared using sonication and accelerated solvent extraction methods [J]. *Talanta*, 2014, 119(119C): 620-622.
- [9] Gao F Y, Hu Y S, Ye X L, *et al.* Optimal extraction and fingerprint analysis of *Cnidii Fructus* by accelerated solvent extraction and high performance liquid chromatographic analysis with photodiode array and mass spectrometry detections [J]. *Food Chem*, 2013, 141(3): 1971-1978.
- [10] 袁 斌, 车金水, 金 燕, 等. 快速溶剂萃取-液相色谱法测定人参药材中人参皂苷的含量 [J]. 药物分析杂志, 2013, 33(7): 1270-1275.
- [11] 王凤美, 李 磊, 柳先平, 等. 丹参药材中丹酚酸 B 的提取及其 HPLC 法测定 [J]. 现代中药研究与实践, 2004, 18(增刊): 62-64.
- [12] 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.
- [13] 张巧月, 杨浩天, 史 贺, 等. HPLC-MS 法同时测定酸枣仁中 9 种成分 [J]. 中草药, 2015, 46(1): 123-127.
- [14] 刘昌辉, 黄小桃, 李颖仪, 等. LC-MS/MS 法测定酸枣仁皂苷 A、B 和斯皮诺素的含量 [J]. 中药新药与临床药理, 2012, 23(1): 69-72.