

UPLC-MS/MS 法结合化学计量学法分析酸枣仁和理枣仁中多指标成分

武宝爱¹, 闫 艳¹, 申晨曦¹, 马 敏², 张福生¹, 杜晨晖^{3*}, 闫 艳^{1*}

1. 山西大学, 山西 太原 030006

2. 山西省食品药品检验所, 山西 太原 030001

3. 山西中医药大学, 山西 太原 030619

摘要: 目的 建立大宗中药材酸枣仁的多指标含量测定方法, 为准确发现酸枣仁和理枣仁中差异性质量控制成分提供参考。方法 采用 UPLC-MS/MS 多反应监测 (multiple reaction monitoring, MRM) 正、负离子切换扫描模式, ACQUITY UPLC HSS T3 色谱柱 (150 mm×2.1 mm, 1.8 μm) 进行分离, 流动相为 0.1% 甲酸水 (A)-乙腈 (B), 进行梯度洗脱, 测定 16 批酸枣仁和 13 批理枣仁中乌药碱、木兰花碱、维采宁 II、斯皮诺素、当药黄素、山柰酚-3-O-芸香糖苷、6'''-阿魏酰斯皮诺素、酸枣仁皂苷 A 和酸枣仁皂苷 B 的含量, 并结合主成分分析 (principal component analysis, PCA) 和偏最小二乘判别分析 (partial least squares discrimination analysis, PLS-DA) 评价酸枣仁和理枣仁中 9 种成分的差异。结果 9 种成分在相应的浓度范围内线性关系良好, 相关系数 (r) > 0.9991, 仪器精密度 RSD < 4.69%, 平均加样回收率为 95.41%~106.25%, RSD < 3.75%。含量测定结果表明酸枣仁中乌药碱、木兰花碱、当药黄素、山柰酚-3-O-芸香糖苷、酸枣仁皂苷 A 和 B 的含量显著高于理枣仁 ($P < 0.01$), 而理枣仁中斯皮诺素、维采宁 II 和 6'''-阿魏酰斯皮诺素的含量显著高于酸枣仁 ($P < 0.01$)。PCA 和 PLS-DA 结果表明, 酸枣仁和理枣仁可明显分开, 两者组内样品成分具有很强的相似性, 而组间差异较大。结论 建立了专属性强、灵敏度高的酸枣仁和理枣仁质量差异性评价方法, 为两者质量差异性评价的指标成分选择提供依据, 为阐明理枣仁可否作为酸枣仁的代用品提供实验基础。

关键词: 酸枣仁; 理枣仁; 乌药碱; 木兰花碱; 维采宁 II; 斯皮诺素; 当药黄素; 山柰酚-3-O-芸香糖苷; 6'''-阿魏酰斯皮诺素; 酸枣仁皂苷 A; 酸枣仁皂苷 B; 质量评价

中图分类号: R286.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2021)08-2400-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.08.024

Study on multi-index components of *Ziziphi Spinosae Semen* and *Ziziphi mauritiana* Semen according to UPLC-MS/MS coupled with chemometrics

WU Bao-ai¹, YAN Feng¹, SHEN Chen-xi¹, MA Min², ZHANG Fu-sheng¹, DU Chen-hui³, YAN Yan¹

1. Shanxi University, Taiyuan 030006, China

2. Shanxi Provincial Institute for Food and Drug Control, Taiyuan 030001, China

3. Shanxi University of Traditional Chinese Medicine, Taiyuan 030619, China

Abstract: Objective To establish a method for simultaneous quantification of multiple components of *Ziziphi Spinosae Semen* (ZSS), in order to provide an applicable strategy to screen out the different marker components between ZSS and *Ziziphi Mauritiana* Semen (ZMS). **Methods** A UPLC-MS/MS method was developed and validated for simultaneous quantification of coclaurine, magnoflorine, vicianin II, spinosin, swertisin, kaempferol-3-O-rutinoside, 6'''-feruylspinosin, jujuboside A, and jujuboside B using multiple reaction monitoring (MRM). Chromatographic separation was achieved with a reversed-phase Acquity UPLC HSS T3 column (150 mm × 2.1 mm, 1.8 μm). Gradient elution was performed with a mobile phase consisting of 0.1% formic acid in Milli-Q ultrapure water (A) and acetonitrile (B). In addition, chemometrics methods, including principal component analysis (PCA), and partial least squares discriminant analysis (PLS-DA), were used to evaluate the differences between ZSS and ZMS. **Results** All the

收稿日期: 2020-09-06

基金项目: 国家自然科学基金青年基金资助项目 (81603289); 国家自然科学基金青年基金资助项目 (81603251); 山西省研究生联合培养基地人才培养项目 (2017JD01); 山西省科技攻关计划振东专项 (2016ZD0105); 山西省青年科技人员培优计划 (05)

作者简介: 武宝爱, 副教授, 研究方向为中医药与运动康复。Tel: (0351)7010611 E-mail: 469203910@qq.com

*通信作者: 闫 艳, 副教授, 研究方向为中药质量评价。Tel: (0351)7018379 E-mail: yanyan520@sxu.edu.cn

杜晨晖, 教授, 研究方向为中药药效物质基础。Tel: (0351)3179935 E-mail: duchenxi_2001@163.com

compounds showed good linearity ($r > 0.9991$) with a relatively wide concentration range, acceptable recovery at 95.41%—106.25%, and RSD% less than 3.75%. The contents of coclaurine, magnoflorine, swertisin, kaempferol-3-O-rutinoside, jujuboside A, and jujuboside B were significantly higher in ZSS than that in ZMS, while the contents of viciin II, spinosin, and 6'''-feruylspinosin in ZSS were significantly lower than that in ZMS. The results from PCA and PLS-DA suggested that ZSS and ZMS could be clearly separated. The sample components in the two groups had strong similarity, but the difference between the two groups was large.

Conclusion A stable and reliable quality evaluation method of ZSS and ZMS was established, which provided a reference for quality marker components and the scientific basis for the feasibility of ZMS to substitute ZSS.

Key words: *Ziziphi Spinosae Semen*; *Ziziphi Mauritanae Semen*; coclaurine; magnoflorine; viciin II; spinosin; swertisin; kaempferol-3-O-rutinoside; 6'''-feruylspinosin; jujuboside A; jujuboside B; simultaneous quantification; quality evaluation

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, 始载于《神农本草经》^[1], 具有养心补肝、宁心安神、敛汗、生津之功效。随着人们生活压力的增大, 失眠人数不断增多, 酸枣仁作为治疗失眠的首选中药市场需求量不断增大, 野生资源逐渐萎缩, 导致其价格不断攀升。与此同时, 大量价格低廉的理枣仁涌入中药材市场伪充酸枣仁或掺入酸枣仁中售卖^[2]。理枣仁为鼠李科植物滇刺枣 *Ziziphus mauritanae* Lam 的干燥成熟种子, 始载于明朝《滇南本草》^[3], 收录于《云南省中药材标准》2005 年版^[4], 具有宁心安神、除烦敛汗的功效, 是云南省地方习用中药材, 用于治疗失眠。

现代药理研究表明, 酸枣仁和理枣仁均可协同戊巴比妥钠延长小鼠睡眠时间^[5]。化学研究表明酸枣仁和理枣仁化学成分种类相似, 均含有大量黄酮、皂苷和生物碱类成分^[6-10]。目前有关酸枣仁和理枣仁的研究多聚焦于采用显微、薄层色谱、红外和核磁共振波谱鉴别对两者进行真伪鉴别^[11-14]。对于两者化学成分的含量测定研究较少且主要集中于分析少数几个化学成分^[15-17]。Zhang 等^[10]采用 UPLC-Q-TOF-MS 结合半定量分析方法表明酸枣仁中富含四环三萜皂苷类和异喹啉类生物碱, 而理枣仁中富含黄酮碳糖和环肽类生物碱。因此, 有必要建立一种同时测定酸枣仁和理枣仁中多成分的含量测定方法, 以期对两者的质量优劣评价提供更加科学的实验依据。

本研究拟选取酸枣仁和理枣仁中黄酮碳糖和甾体类、异喹啉类生物碱和四环三萜皂苷类 3 种主要的差异成分进行分析, 选取了文献报道具有改善睡眠、学习记忆功能、抗焦虑且含量相对较高的 9 种化学成分作为定量目标^[18-24]。众所周知, 三重四级杆质谱的多重反应监测 (MRM) 模式是质谱定量的金标准, 具有特异性强、准确度高和灵敏度高的特

点, 适合于中药复杂体系中多个化学成分的同时定量分析。因此, 本研究采用 UPLC-MS/MS 对酸枣仁和理枣仁中的乌药碱、木兰花碱、当药黄素、斯皮诺素、6'''-阿魏酰斯皮诺素、维采宁 II、酸枣仁皂苷 A 和酸枣仁皂苷 B 进行同时定量分析, 为准确发现酸枣仁和理枣仁中差异性质量控制成分提供科学、合理的实验依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器

CPA225D 型十万分之一分析天平 (德国 Sartorius 公司); 岛津 LC-MS/MS 系统, 包括 LC-30AD 二元泵、CTO-30A 柱温箱、SIL-20A 自动进样器、DGU-20As 在线脱气机, MS-8050 质谱仪, LabSolutions 工作站 (日本岛津公司); Milli-Q 去离子水发生器 (美国 Millipore 公司); Neofuge 13R 高速冷冻离心机 (上海力申科学仪器有限公司)。

1.2 试剂

对照品乌药碱 (批号 HC225036198)、木兰花碱 (批号 20160710)、维采宁 II (批号 HV187847198)、斯皮诺素 (批号 20160314)、山柰酚-3-O-芸香糖苷 (批号 20170417)、6'''-阿魏酰斯皮诺素 (批号 20160303)、酸枣仁皂苷 A (批号 20160315) 和当药黄素 (批号 140516) 均购于宝鸡市辰光生物科技有限公司; 酸枣仁皂苷 B (批号 20170210) 购于南京春秋生物工程有限公司, 所有对照品质量分数均大于 98%。16 批酸枣仁和 13 批理枣仁购自河北安国药材市场和昆明菊花药材市场, 经山西中医药大学杜晨晖副教授鉴定, 分别为鼠李科植物酸枣 *Z. jujuba* Mill. var. *spinosa* (Bunge) Hu ex H. F. Chou 的干燥成熟种子和鼠李科植物滇刺枣 *Z. mauritanae* Lam. 的干燥成熟种子, 所有样品留样于山西大学中医药现代研究中心冷库。

质谱级乙腈和甲酸 (Fisher 公司), 水为 Millipore 超纯水, 其它试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 供试品溶液的制备

分别取酸枣仁和理枣仁样品粉末(过四号筛)约 1 g, 精密称定, 置索氏提取中, 加石油醚(60~90 °C) 90 mL, 加热回流 4 h, 药渣挥去溶剂, 转移至圆底烧瓶, 加入 70%乙醇 20 mL, 加热回流提取 2 h, 滤过, 药渣用 70%乙醇 5 mL 洗涤, 合并洗液与滤液, 回收溶剂至干, 残渣加甲醇溶解, 转移至 5 mL 量瓶中定容, 过 0.22 μm 微孔滤膜, 取续滤液即得, 4 °C 保存, 备用。

2.2 对照品溶液的制备

分别称取对照品乌药碱和木兰花碱适量, 精密称定, 加初始流动相制备成质量浓度分别为 2.024 mg/mL 和 2.016 mg/mL 的母液; 分别称取对照品维采宁 II、斯皮诺素、当药黄素、山柰酚-3-O-芸香糖苷、6'''-阿魏酰斯皮诺素、酸枣仁皂苷 A 和酸枣仁皂苷 B 适量, 精密称定, 加入甲醇制成质量浓度分别为 2.0、2.1、2.1、2.0、2.0、2.1、2.0 mg/mL 的母液; 将母液精密量取适量, 制成质量浓度为 15.2、60.5、9.0、36.9、2.0、3.1、

20.9、25.7、6.1 μg/mL 的混合对照品工作溶液; 加甲醇逐级稀释制成 6 种质量浓度梯度的标准曲线工作溶液。

2.3 色谱质谱条件

2.3.1 色谱条件 ACQUITY UPLC HSS T3 色谱柱(150 mm×2.1 mm, 1.8 μm); 流动相为 0.1%甲酸水(A)-乙腈(B), 梯度洗脱程序为 0~2 min, 17% B; 2~4 min, 17%~19% B; 4~10 min, 19%~33% B; 10~15 min, 33%~100% B, 15~20 min, 100%~17% B, 体积流量为 0.15 mL/min; 柱温为 40 °C; 进样量为 3 μL。

2.3.2 质谱条件 ESI 离子源; 扫描模式: 正负离子切换; 雾化器流量 2.0 L/min; 干燥器流量 10.0 L/min; 加热气流量 10.0 L/min; 接口电压: 4.0 kV; 接口温度 300 °C; 去溶剂管温度(desolvation line, DL) 250 °C; 加热块温度 400 °C; 碰撞诱导解离电压(collision induced dissociation, CID) 270 kPa。9 种成分相应的质谱参数及 MRM 离子对见表 1。在此条件下, 酸枣仁和理枣仁样品及混合对照品的色谱图见图 1。

表 1 9 种化学成分的质谱参数

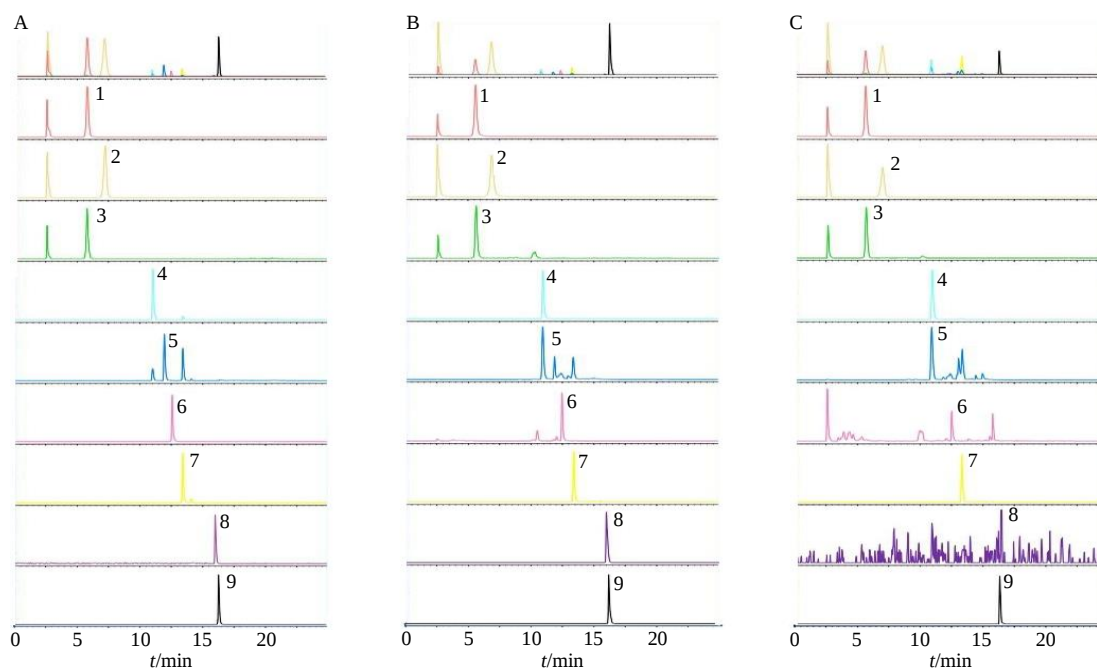
Table 1 Mass spectrum parameters of nine components

指标成分	离子化方式	MRM 离子对	预杆电压 Q1/V	碰撞能量 CE/V	预杆电压 Q3/V
乌药碱	[M+H] ⁺	286.0→194.1	42	46	42
木兰花碱	[M] ⁺	342.1→222.3	35	30	35
维采宁 II	[M+H] ⁺	595.3→325.3	115	48	115
斯皮诺素	[M+H] ⁺	609.5→327.3	98	35	98
当药黄素	[M+H] ⁺	447.2→267.2	38	35	38
山柰酚-3-O-芸香糖苷	[M+H] ⁺	595.2→287.3	35	30	35
6'''-阿魏酰斯皮诺素	[M+H] ⁺	785.4→327.3	76	46	76
酸枣仁皂苷 A	[M-H] ⁻	1205.3→1073.8	32	46	30
酸枣仁皂苷 B	[M-H] ⁻	1043.3→911.1	50	37	34

2.4 方法学考察

2.4.1 线性关系考察 取“2.2”项下制备的 6 种质量浓度梯度的混合对照品工作溶液, 按上述色谱质谱条件进行样品分析, 记录色谱图及峰面积。以峰面积为纵坐标(Y), 质量浓度为横坐标(X), 进行线性回归; 结果表明, 在考察范围内, 9 种测定的成分的浓度与峰面积呈良好的线性关系, *r* 都大于 0.999, 见表 2。取上述混合对照品溶液适量, 用 70%甲醇稀释成浓度梯度由高到低的一系列溶液, 进样, 取信噪比 S/N=3 和 S/N=10 的混合对照品溶液作为 9 种成分的检测限(LOD)和定量限(LOQ), 见表 2。

2.4.2 精密度试验 精密吸取同一混合对照品溶液, 按“2.3”项下条件连续进样 6 次, 记录 9 种待测成分的峰面积, 并计算峰面积的 RSD 值, 考察日内精密度; 连续分析 3 d, 计算 9 种成分峰面积的 RSD 值, 考察日间精密度。乌药碱、木兰花碱、维采宁 II、斯皮诺素、当药黄素、山柰酚-3-O-芸香糖苷、6'''-阿魏酰斯皮诺素、酸枣仁皂苷 A 和酸枣仁皂苷 B 的日内精密度 RSD 值分别为 1.46%、1.59%、2.24%、1.35%、2.92%、2.74%、2.33%、1.23%、1.75%和乌药碱、木兰花碱、维采宁 II、斯皮诺素、当药黄素、山柰酚-3-O-芸香糖苷、6'''-阿魏酰斯皮诺素、酸枣仁皂苷 A 和酸枣仁皂苷 B



1-乌药碱 2-木兰花碱 3-维采宁 II 4-斯皮诺素 5-当药黄素 6-山柰酚-3-O-芸香糖苷 7-6'''-阿魏酰斯皮诺素 8-酸枣仁皂苷 A 9-酸枣仁皂苷 B
1-coclaurine 2-magnoflorine 3-vicenin II 4-spinosin 5-swertisin 6-kaempferol-3-O-rutinoside 7-6'''-feruylspinosin 8-jujuboside A 9-jujuboside B

图 1 混合对照品溶液 (A)、酸枣仁样品 (B) 和理枣仁样品 (C) 中 9 种成分的 MRM 质谱图

Fig. 1 MRM mass spectra of nine components in mixed standard solutions (A), ZSS (B), and ZMS (C)

表 2 9 种指标成分的回归方程、 r 、线性范围、LOD 和 LOQ

Table 2 Liner regression, correlation coefficient, range, LOD, and LOQ of nine components

指标成分	回归方程	r	线性范围/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	LOD/ $(\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1})$	LOQ/ $(\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1})$
乌药碱	$Y=3.31\times 10^6 X+1.44\times 10^6$	0.999 5	0.30~5.06	0.90	1.10
木兰花碱	$Y=9.27\times 10^5 X+2.08\times 10^6$	0.999 9	0.90~30.24	1.00	3.40
维采宁 II	$Y=5.85\times 10^4 X+3.18\times 10^3$	0.999 2	0.09~10.50	5.00	15.00
斯皮诺素	$Y=1.52\times 10^5 X+1.08\times 10^5$	0.999 5	0.55~36.94	12.30	60.00
当药黄素	$Y=3.51\times 10^6 X+6.81\times 10^3$	0.999 9	0.01~0.50	1.40	5.00
山柰酚-3-O-芸香糖苷	$Y=1.06\times 10^6 X-2.14\times 10^4$	0.999 7	0.03~2.55	0.85	3.40
6'''-阿魏酰斯皮诺素	$Y=2.27\times 10^5 X-2.19\times 10^5$	0.999 1	1.05~31.41	3.60	11.00
酸枣仁皂苷 A	$Y=1.22\times 10^4 X+767$	0.999 5	0.93~25.70	7.30	70.00
酸枣仁皂苷 B	$Y=3.56\times 10^6 X+3.88\times 10^5$	0.999 5	0.12~5.06	0.18	0.42

日间精密度 RSD 值分别为 2.88%、4.69%、2.29%、2.74%、2.81%、2.66%、2.43%、3.59%、2.86%，表明仪器精密度良好。

2.4.3 稳定性试验 取编号为酸枣仁 1 号样品，按“2.1”项下方法制备供试品溶液，分别于室温下放置 0、2、4、6、12 和 24 h，按“2.3”项下方法进行测定，记录待测成分的峰面积，计算 RSD 值，乌药碱、木兰花碱、维采宁 II、斯皮诺素、当药黄素、山柰酚-3-O-芸香糖苷、6'''-阿魏酰斯皮诺素、酸枣仁皂苷 A 和酸枣仁皂苷 B 分别为 0.41%、0.29%、1.76%、0.62%、1.96%、1.27%、0.66%、0.95% 和 1.58%，表明供试品溶液 24 h 内稳定。

2.4.4 重复性试验 称取编号为 01 的同一批酸枣仁样品 6 份，每份约 1 g，精密称定，按“2.1”项下方法平行制备 6 份供试品溶液，按“2.3”项下的色谱质谱条件进行测定。乌药碱、木兰花碱、维采宁 II、斯皮诺素、当药黄素、山柰酚-3-O-芸香糖苷、6'''-阿魏酰斯皮诺素、酸枣仁皂苷 A 和酸枣仁皂苷 B 的 RSD 分别为 0.94%、0.85%、1.59%、0.72%、0.24%、0.84%、0.59%、4.16%、1.83%。

2.4.5 加样回收率试验 称取已测定的酸枣仁样品（编号酸枣仁 1）6 份，每份约 0.5 g，精密加入与样品中各成分含量相当的混合对照品溶液，按“2.1”项下方法制备供试品溶液，按上述色谱质谱条件进

行分析,记录 9 种待测成分的色谱峰面积,并计算其各成分的加样回收率及相应的 RSD 值。乌药碱、木兰花碱、维采宁 II、斯皮诺素、当药黄素、山柰酚-3-O-芸香糖苷、6'''-阿魏酰斯皮诺素、酸枣仁皂苷 A 和酸枣仁皂苷 B 的平均回收率分别为 99.55%、102.62%、106.25%、95.41%、104.92%、99.96%、104.23%、103.39%、99.08%,其 RSD 分别为 2.50%、0.69%、0.89%、2.03%、1.69%、2.40%、1.79%、3.20%、1.03%,表明提取方法的准确度高。

2.5 含量测定

取 16 批酸枣仁和 13 批理枣仁样品,按“2.1”项下方法制备供试品溶液,并按上述色谱质谱条件进样分析,并对 9 种成分的平均含量做箱图。如图 2、表 3 所示,酸枣仁中乌药碱、木兰花碱、当药黄素、山柰酚-3-O-芸香糖苷、酸枣仁皂苷 A 和 B 的含量显著高于理枣仁 ($P < 0.01$),而理枣仁中斯皮诺素、维采宁和 6'''-阿魏酰斯皮诺素的含量显著高于酸枣仁 ($P < 0.01$)。

2.6 多元统计分析

主成分分析 (PCA) 和偏最小二乘判别 (PLS-DA) 分析可用于同种样品之间的相似性和不同种样品间的差异性的关系和趋势研究。为了进一

步直观比较酸枣仁和理枣仁中 9 种化学成分的差异,采用 MetaboAnalyst 网站分别对 29 批样品中 9 种成分的含量进行 PCA 和 PLS-DA 分析。从 PCA 得分图 (图 3) 可知,前 2 个主成分 PC1 和 PC2,共解释了 80.2% 的变量,且酸枣仁和理枣仁可以明显分开。其中酸枣仁和理枣仁的组内差异可能是由于不同产地的样本所导致的。为了缩小组内差异,进而对 29 批样品中 9 种成分的含量进行 PLS-DA 分析,得到其前 2 个主成分 PC1 和 PC2,共解释了 78.9% 的变量。且两者的组内差异缩小,组间差异增大,表明酸枣仁和理枣仁种内样品成分具有很强的相似性,而种间差异较大。

3 讨论

3.1 色谱质谱条件的优化

酸枣仁中存在大量的同分异构体,如斯皮诺素和异斯皮诺素,当药黄素和异当药黄素等。为实现 9 种成分完全分离和快速检测,分别对流动相组合以及流动相梯度进行优化,最终以 0.1% 甲酸水和乙腈为流动相,20 min 的梯度洗脱程序进行分析。在此条件下,9 种成分色谱峰专属性好,且分析时间短。此外,分别质谱的最佳碰撞能量 (CE) 进行优化,以获得响应强度较高的色谱峰。在此色谱质谱

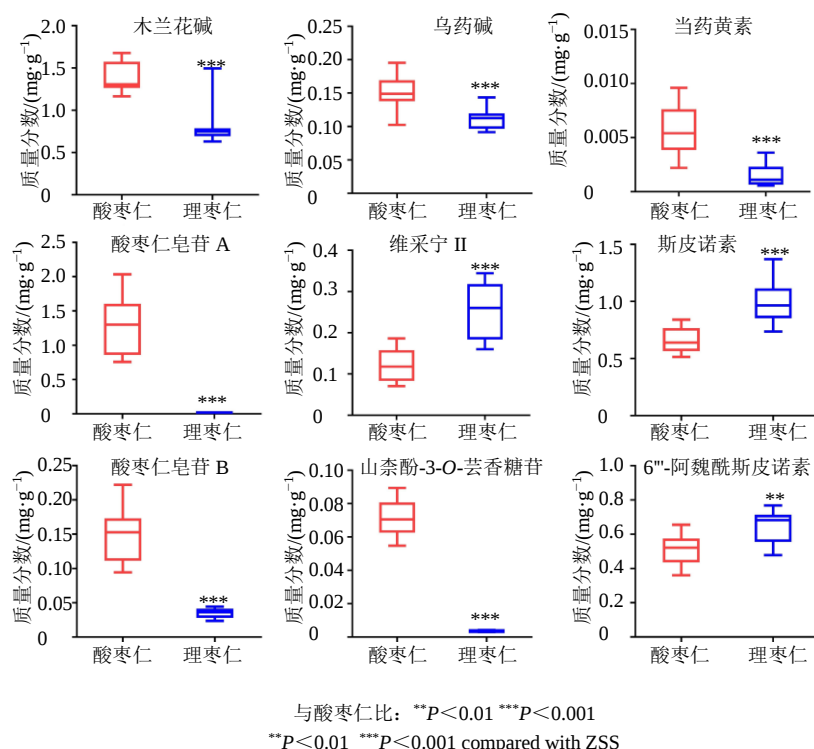


图 2 酸枣仁和理枣仁中 9 种成分的含量箱状图 ($n=4$)

Fig. 2 Contents histogram of nine components from ZSS and ZMS ($n=4$)

表 3 酸枣仁和理枣仁 9 种成分的含量 (n=4)

Table 3 Contents of nine components from ZSS and ZMS (n=4)

编号	质量分数(mg·g ⁻¹)								
	乌药碱	木兰花碱	维采宁Ⅱ	斯皮诺素	当药黄素	山柰酚-3-O-云香糖苷6'''-阿魏酰斯皮诺素	酸枣仁皂苷 A	酸枣仁皂苷 B	
酸枣仁 1	0.180 0±0.000	71.267 9±0.003	30.114 9±0.003	70.673 7±0.006	60.006 1±0.000	0.076 8±0.000	0.560 9±0.000	0.934 7±0.010	
酸枣仁 2	0.102 3±0.000	71.464 9±0.000	70.156 3±0.005	20.633 4±0.016	10.002 8±0.000	0.059 1±0.000	0.566 1±0.000	1.653 0±0.015	
酸枣仁 3	0.144 6±0.000	71.307 9±0.014	80.086 4±0.000	40.579 2±0.001	60.004 5±0.000	0.054 8±0.000	0.446 1±0.001	0.858 7±0.007	
酸枣仁 4	0.149 4±0.000	51.267 5±0.007	70.082 2±0.001	30.568 4±0.001	80.004 7±0.000	0.089 4±0.001	0.432 1±0.003	0.861 8±0.000	
酸枣仁 5	0.147 9±0.000	41.241 4±0.040	40.158 4±0.003	90.725 7±0.017	90.007 8±0.000	0.079 2±0.003	0.468 2±0.004	1.819 8±0.008	
酸枣仁 6	0.195 4±0.000	31.674 7±0.002	40.072 1±0.000	90.613 9±0.008	20.003 8±0.000	0.083 4±0.000	0.537 9±0.000	0.757 0±0.000	
酸枣仁 7	0.152 0±0.000	81.652 7±0.022	20.110 4±0.000	30.645 3±0.003	50.004 0±0.000	0.088 1±0.000	0.504 3±0.004	0.821 7±0.004	
酸枣仁 8	0.152 9±0.010	41.678 0±0.094	40.075 0±0.000	50.564 4±0.017	70.002 2±0.000	0.081 2±0.004	0.431 0±0.028	0.840 8±0.114	
酸枣仁 9	0.170 8±0.005	01.448 8±0.004	30.070 5±0.000	10.553 7±0.001	60.008 2±0.000	0.069 9±0.001	0.360 7±0.005	1.131 0±0.016	
酸枣仁 10	0.148 8±0.000	61.262 9±0.025	50.186 3±0.002	30.765 9±0.001	90.014 1±0.000	0.076 9±0.000	0.579 0±0.015	1.609 6±0.006	
酸枣仁 11	0.144 2±0.000	01.606 7±0.020	40.168 7±0.007	40.767 3±0.001	20.0124±0.000	0.064 1±0.000	0.579 1±0.013	1.466 8±0.034	
酸枣仁 12	0.119 9±0.000	21.475 4±0.005	20.121 0±0.000	10.562 4±0.003	00.004 0±0.000	0.060 2±0.000	0.470 7±0.002	1.134 5±0.004	
酸枣仁 13	0.135 8±0.000	21.304 2±0.006	80.089 0±0.000	00.514 4±0.017	50.009 6±0.000	0.066 3±0.000	0.363 4±0.000	2.034 7±0.002	
酸枣仁 14	0.103 9±0.000	41.164 1±0.001	50.146 5±0.000	00.772 9±0.007	90.003 1±0.000	0.062 0±0.000	0.553 7±0.007	1.591 3±0.010	
酸枣仁 15	0.172 2±0.000	51.299 1±0.002	90.134 0±0.000	00.782 6±0.000	00.008 0±0.000	0.068 5±0.000	0.610 8±0.007	1.517 3±0.005	
酸枣仁 16	0.164 5±0.000	61.226 7±0.003	20.163 6±0.001	60.840 8±0.006	30.006 8±0.000	0.071 1±0.000	0.655 5±0.002	1.592 2±0.021	
理枣仁 1	0.143 4±0.004	10.755 6±0.002	00.314 4±0.042	21.023 4±0.066	80.002 6±0.000	0.004 2±0.000	0.730 3±0.021	—	
理枣仁 2	0.141 0±0.000	10.759 8±0.001	00.344 5±0.002	30.965 6±0.001	10.002 0±0.000	0.003 5±0.000	0.714 7±0.007	—	
理枣仁 3	0.119 4±0.002	20.684 6±0.040	70.322 7±0.044	80.959 5±0.067	10.001 1±0.000	0.004 0±0.000	0.677 7±0.050	—	
理枣仁 4	0.097 6±0.000	01.313 5±0.003	20.260 3±0.001	00.831 3±0.007	10.001 0±0.000	0.003 0±0.000	0.661 1±0.004	—	
理枣仁 5	0.112 5±0.000	51.632 9±0.002	30.236 3±0.001	00.875 1±0.006	40.003 0±0.000	0.003 9±0.000	0.537 8±0.005	—	
理枣仁 6	0.104 0±0.000	30.748 9±0.001	50.292 9±0.007	70.982 4±0.015	20.001 9±0.000	0.003 6±0.000	0.713 2±0.004	—	
理枣仁 7	0.091 6±0.000	20.700 7±0.018	80.080 1±0.000	21.220 5±0.003	20.001 8±0.000	0.003 6±0.000	0.607 3±0.003	—	
理枣仁 8	0.114 8±0.000	40.709 5±0.015	70.087 8±0.000	51.370 7±0.004	10.001 0±0.000	0.004 1±0.000	0.681 8±0.002	—	
理枣仁 9	0.095 5±0.000	50.759 1±0.002	40.318 4±0.005	41.105 3±0.005	00.000 8±0.000	0.003 9±0.000	0.767 6±0.001	—	
理枣仁 10	0.110 5±0.000	10.679 2±0.017	20.318 0±0.002	41.124 1±0.004	90.000 6±0.000	0.003 3±0.000	0.691 2±0.002	—	
理枣仁 11	0.095 3±0.000	31.493 9±0.030	10.183 6±0.000	00.737 0±0.000	00.000 7±0.000	0.003 4±0.000	0.477 6±0.000	—	
理枣仁 12	0.119 5±0.000	40.631 2±0.003	10.196 8±0.000	20.921 7±0.003	20.003 6±0.000	0.003 2±0.000	0.573 0±0.006	—	
理枣仁 13	0.119 9±0.000	60.731 7±0.000	40.184 1±0.000	50.788 6±0.026	20.000 6±0.000	0.003 3±0.000	0.479 8±0.004	—	

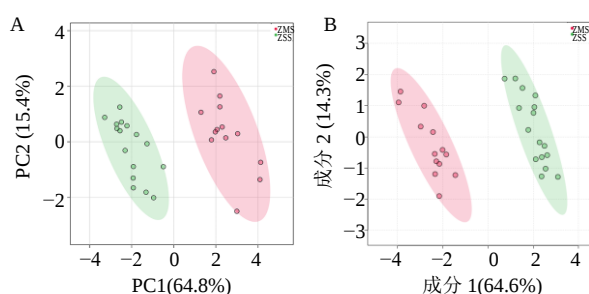


图 3 酸枣仁和理枣仁的 PCA (A) 和 PLS-DA (B) 图
Fig. 3 PCA score and PLS-DA (A) score of ZSS and ZMS (B)

条件下, 9 种成分的线性关系良好, 相关系数均在 0.999 以上, 且线性范围相对较宽。

3.2 含量测定指标成分的选择

Cheng 等^[6]研究表明口服给予当药黄素 (4×10⁻⁵ mol/kg) 可延长 (29%~31%) 戊巴比妥诱导小鼠的睡眠时间。Oh 等^[18]研究表明当药黄素可通过腺苷 A1 受体拮抗作用改善东莨菪碱诱导的小鼠记忆障碍。江南等^[19]发现当药黄素具有抗抑郁活性,

其抗抑郁活性可能与抑制 5-羟色胺 (5-hydroxytryptamine, 5-HT) 重摄取、增强脑内神经递 5-HT 神经功能和影响去甲肾上腺素有关。Wang 等^[20]研究表明斯皮诺素能够协同戊巴比妥钠小鼠睡眠, 缩短睡眠潜伏期, 延长睡眠时间, 其作用机制与突触后 5-HT_{1A} 受体相关。You 等^[21]研究表明酸枣仁皂苷 A 对大鼠海马神经元细胞 γ 氨基丁酸 A (GABA_A) 受体 mRNAs 表达的影响, 结果显示高低剂量的酸枣仁皂苷 A 均可显著影响 GABA_A 受体 mRNAs 的 α1、α5、β2 亚型基因表达。Wang 等^[22]基于代谢组学和生物数据通路分析, 结果表明 JuB 给予野生型黑腹果蝇失眠模型后, 可以使其与失眠相关的 12 种差异代谢产物调向健康水平。本课题组采用血清化学与网络药理学结合, 初步阐释了乌药碱、斯皮诺素和酸枣仁皂苷 A 与睡眠相关靶点蛋白有关, 是潜在的改善睡眠物质^[23]。阿朴吗啡类木兰花碱可促进细胞 Cl⁻内流, 通过 GABAergic 作用机制发挥镇静和抗焦虑的作用^[24]; 山柰酚-3-O-

芸香糖苷可以清除 H_2O_2 和抑制透明质酸酶的活性, 从而发挥抗氧化和抗衰老的作用^[25]。因此, 选择以上 9 种具有活性且含量稳定的化合物作为测定指标。

3.3 药典测定指标成分的分析

本研究显示 16 批酸枣仁中斯皮诺素的平均含量为 0.07%, 低于《中国药典》2015 年版规定酸枣仁中斯皮诺素含量不低于 0.08% 的要求。大部分黄酮成分多数在成熟期进行累积, 分析其含量不达标的原因可能是在酸枣的采摘过程中抢青造成的, 有待进一步的深入研究。

4 结论

本研究建立了一种采用 UPLC-MS/MS 同时测定乌药碱、木兰花碱、当药黄素、斯皮诺素、6'''-阿魏酰斯皮诺素、维采宁II、山柰酚-3-O-芸香糖苷、酸枣仁皂苷 A 和酸枣仁皂苷 B 的含量测定方法, 其专属性强、灵敏度高、分析时间短、线性范围宽, 并成功应用于 16 批酸枣仁和 13 批理枣仁中 9 种成分的含量测定中。酸枣仁中乌药碱、木兰花碱、当药黄素、山柰酚-3-O-芸香糖苷、酸枣仁皂苷 A 和酸枣仁皂苷 B 含量显著高于理枣仁; 而斯皮诺素、6'''-阿魏酰斯皮诺素和维采宁II含量显著低于理枣仁。多元统计分析结果表明这 9 种成分的含量可以有效区分酸枣仁和理枣仁, 为进一步将其作为质量差异性评价的指标成分提供依据, 为阐明理枣仁可否作为酸枣仁的代用品提供实验基础。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 孙星衍, 孙冯翼. 神农本草经 [M]. 南宁: 广西科学技术出版社, 2016: 49-50.
- [2] 马双成, 王翀, 朱炯, 等. 整体质量良好全程管控需加强: 从 5 年国抽检验结果透析中成药整体质量状况 [N]. 中国医药报, 2020-03-30(4).
- [3] 兰茂. 滇南本草 [M]. 昆明: 云南科技出版社, 2012: 99.
- [4] 云南省中药材标准 [S]. 2005: 77.
- [5] 方子年, 郑玲. 绵枣仁与酸枣仁的比较 [J]. 中草药, 1987, 18(4): 29-30.
- [6] Cheng G, Bai Y J, Zhao Y Y, et al. Flavonoids from *Ziziphus jujuba* Mill var. *spinosa* [J]. *Tetrahedron*, 2000, 56(45): 8915-8920.
- [7] Matsuda H, Murakami T, Ikebata A, et al. Bioactive saponins and glycosides. XIV. Structure elucidation and immunological adjuvant activity of novel protojubenogenin type triterpene bisdesmosides, protojubenosides A, B, and B1, from the seeds of *Ziziphus jujuba* var. *spinosa* (Zizyphi Spinosi Semen) [J]. *Chem Pharm Bull* (Tokyo), 1999, 47(12): 1744-1748.
- [8] Han B H, Park M H, Park J H. Chemical and pharmacological studies on sedative cyclopeptide alkaloids in some Rhamnaceae plants [J]. *Pure Appl Chem*, 1989, 61(3): 443-448.
- [9] Wang B, Zhu H T, Wang D, et al. New spinosin derivatives from the seeds of *Ziziphus mauritiana* [J]. *Nat Prod Bioprospecting*, 2013, 3(3): 93-98.
- [10] Zhang F X, Li M, Qiao L R, et al. Rapid characterization of Zizyphi Spinosae Semen by UPLC/Qtof MS with novel informatics platform and its application in evaluation of two seeds from *Ziziphus* species [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2016, 122: 59-80.
- [11] 王雪, 杨光, 周修腾, 等. 酸枣仁、理枣仁及枳椇子的显微鉴别 [J]. 现代中药研究与实践, 2018, 32(3): 9-12.
- [12] Guo L G, Sun S, Li H, et al. Primary study of novel method for determination of saponin in zizyphi spinosae semen (Suan-Zao-ren) by digitally scanning the photo of the HPTLC image without configuration of TLC scanner facility [J]. *Chin Med*, 2014, 5(4): 211-217.
- [13] 李彦文, 周凤琴, 王丽萍, 等. 酸枣仁与其伪品滇枣仁的 FTIR 指纹图谱鉴别 [J]. 中医学刊, 2005, 23(4): 713-715.
- [14] 申晨曦, 杜晨晖, 李震宇, 等. 基于氢核磁共振与偏最小二乘法对酸枣仁及其掺伪品的鉴别 [J]. 食品科学, 2020, 41(8): 275-281.
- [15] 夏苗芬, 董珂, 朱翎林. 薄层扫描法测定酸枣仁中酸枣仁皂苷 A 含量 [J]. 中国药师, 2007, 10(2): 180-181.
- [16] 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.
- [17] Guo S, Duan J N, Li Y Q, et al. Comparison of the bioactive components in two seeds of *Ziziphus* species by different analytical approaches combined with chemometrics [J]. *Front Pharmacol*, 2017, 8: 609.
- [18] Oh H K, Jeon S J, Lee S, et al. Swertisin ameliorates pre-pulse inhibition deficits and cognitive impairment induced by MK-801 in mice [J]. *J Psychopharmacol*, 2017, 31(2): 250-259.
- [19] 江南, 许晓燕, 余梦瑶, 等. 当药黄素抗抑郁作用研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2019, 31(1): 129-134.
- [20] Wang L E, Cui X Y, Cui S Y, et al. Potentiating effect of spinosin, a C-glycoside flavonoid of *Semen Ziziphi spinosae*, on pentobarbital-induced sleep may be related to postsynaptic 5-HT(1A) receptors [J]. *Phytomedicine*,

- 2010, 17(6): 404-409.
- [21] You Z L, Xia Q, Liang F R, *et al.* Effects on the expression of GABAA receptor subunits by jujuboside A treatment in rat hippocampal neurons [J]. *J Ethnopharmacol*, 2010, 128(2): 419-423.
- [22] Wang X, Yang B, Sun H, *et al.* Pattern recognition approaches and computational systems tools for ultra performance liquid chromatography-mass spectrometry-based comprehensive metabolomic profiling and pathways analysis of biological data sets [J]. *Anal Chem*, 2012, 84(1): 428-439.
- [23] 李强, 杜晨晖, 张敏, 等. 血清化学与网络药理学关联研究酸枣仁的体内效应成分 [J]. *中草药*, 2017, 48(10): 1936-1943.
- [24] de la Peña J B I, Lee H L, Yoon S Y, *et al.* The involvement of magnoflorine in the sedative and anxiolytic effects of *Sinomeni Caulis* et *Rhizoma* in mice [J]. *J Nat Med*, 2013, 67(4): 814-821.
- [25] Liana L N, Rizal R, Widowati W, *et al.* Antioxidant and anti-hyaluronidase activities of dragon fruit peel extract and kaempferol-3-O-rutinoside [J]. *J Kedokteran Brawijaya*, 2019, 30(4): 247.

[责任编辑 时圣明]