

- 455-461.
- [28] 黄俊鑫,王碧霞,邹汉斌,等.基于网络药理学和分子对接探究防己茯苓汤治疗缺血再灌注急性肾损伤的作用机制[J].中国实验方剂学杂志,2022,28(8):175-182.
- [29] 安景铄,孙文静,王樱博,等.基于网络药理学分析三七治疗肝细胞癌的作用机制[J].中医学报,2020,35(4):848-852.
- [30] MOLINA SP, LUJAMBIO A. Iron overload and liver cancer[J]. J Exp Med. 2019, 216(4): 723-724.
- [31] 黄有星,张生,刘开睿.半枝莲提取物逆转上皮间质转化抑制肝癌细胞迁移侵袭研究[J].新中医,2019,51(8):17-21.
- [32] 刘钢.半枝莲抗肿瘤临床应用概述[J].海峡药学,2017,29(6):132-134.
- [33] HANH TTH, ANH DH, QUANG TH, et al. Scutebarbatolides A-C, new neo-clerodane diterpenoids from *Scutellaria barbata* D. Don with cytotoxic activity [J]. Phytochem Lett, 2019, 29: 65-69.
- [34] XU J, LIN H, WU G, et al. IL-6/STAT3 Is a Promising therapeutic target for hepatocellular carcinoma [J]. Front Oncol, 2021, 11: 760971. DOI: 10.3389/fonc.2021.760971.
- [35] 音金萍,岳紫晨,卓少元.STAT3:慢性炎症介导肝癌进程的关键分子[J].临床肝胆病杂志,2020,36(4):948-952.
- [36] 董智琦.炎症趋化因子CCL1、CCL20、CXCL5在肝癌细胞中对相关信号通路关键蛋白磷酸化的影响[D].遵义:遵义医科大学,2019.
- [37] WANG LT, LIU KY, CHIOU SS, et al. Phosphorylation of intestine-specific homeobox by ERK1 modulates oncogenic activity and sorafenib resistance[J]. Cancer Lett, 2021, 520: 160-171.
- [38] TORAIH EA, ALREFAI HG, HUSSEIN MH, et al. Overexpression of heat shock protein HSP90AA1 and translocase of the outer mitochondrial membrane TOM34 in HCV-induced hepatocellular carcinoma: a pilot study[J]. Clin Biochem, 2019, 63: 10-17.
- [39] LIU B, FANG X, KWONG DL, et al. Targeting TROY-mediated P85a/AKT/TBX3 signaling attenuates tumor stemness and elevates treatment response in hepatocellular carcinoma [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2022, 41(1): 182.
- [40] SCHEITER A, EVERT K, REIBENSPIES L, et al. RASSF1A independence and early galectin-1 upregulation in PIK3CA-induced hepatocarcinogenesis: new therapeutic venues [J]. Mol Oncol, 2022, 16(5): 1091-1118.
- [41] 胡杰,韩正祥,杜秀平.神经纤毛蛋白1和血管内皮生长因子受体2在肝细胞癌组织中的表达和临床意义[J].安徽医药,2021,25(3):512-515,639.
- [42] SHIZU R, YOSHINARI K. Nuclear receptor CAR-mediated liver cancer and its species differences [J]. Expert Opin Drug Metab Toxicol, 2020, 16(4): 343-351.
- [43] 周晓思.PD-1/PD-L1在原发性肝癌中的表达及临床意义[D].合肥:安徽医科大学,2019.
- [44] FAIVRE M, COTTRT V, BOUR JB, et al. Impact of cytomegalovirus infection on the outcome of patients with cirrhosis: a preliminary study[J]. J Clin Gastroenterol, 2019, 53(3): 236-241.

(收稿日期:2022-10-13,修回日期:2022-11-11)

引用本文:张艳慧,付萍萍,汪安,等.酸枣仁中掺理枣仁的高效液相色谱法鉴别方法研究[J].安徽医药,2024,28(3):482-485.DOI:10.3969/j.issn.1009-6469.2024.03.011.

◇ 药物分析 ◇



## 酸枣仁中掺理枣仁的高效液相色谱法鉴别方法研究

张艳慧<sup>1</sup>,付萍萍<sup>1</sup>,汪安<sup>2</sup>,张明童<sup>3</sup>,王楠<sup>1</sup>,李家港<sup>1</sup>

作者单位:<sup>1</sup>保定市食品药品检验所,河北 保定071000;<sup>2</sup>池州市质量监督检验研究院,安徽 池州247100;<sup>3</sup>甘肃省药品检验研究院(甘肃省中藏药检验检测技术工程实验室,国家药品监督管理局中药材及饮片质量控制重点实验室),甘肃 兰州730070

通信作者:付萍萍,女,主任药师,研究方向为药品质量控制与评价,Email:fupp2008@163.com

基金项目:国家药品监督管理局中药材及饮片质量控制重点实验室项目(2022GSMMPA-KL12,2022GSMMPA-KL10);河北省市场监督管理局科技计划项目(2020ZD36);甘肃省药品科研项目(2022GSMMPA0017);兰州市科技计划项目资助(2022-3-41)

**摘要** 目的 建立测定酸枣仁和理枣仁中6'''-芥子酰斯皮诺素含量的高效液相色谱法(HPLC),以鉴别酸枣仁中掺理枣仁。方法 2020年12月至2022年12月,采用HPLC法,选用Agela Venusil ASB C18柱(4.6 mm×200 mm, 5 μm);以乙腈-0.2%冰醋酸水溶液为流动相梯度洗脱,对酸枣仁及理枣仁中6'''-芥子酰斯皮诺素的含量进行分析测定;检测波长:335 nm;体积流量:1.0 mL/min,柱温为30 °C。结果 6'''-芥子酰斯皮诺素在2.32~138.96 μg/L(r=1)内呈良好的线性关系。理枣仁平均加样回收率为97.5%,相对标准偏差(RSD)为1.5%。酸枣仁平均加样回收率为97.8%,RSD为1.7%。6'''-芥子酰斯皮诺素在酸枣仁中含量范围为0.003 3%~0.005 1%,在理枣仁中含量范围为0.050 6%~0.066 0%。结论 建立的6'''-芥子酰斯皮诺素 HPLC 含量测定分析方法灵敏度高、专属性强、重现性好,可用于酸枣仁中掺理枣仁的鉴别研究。

**关键词** 酸枣仁; 药物污染; 理枣仁; 6'''-芥子酰斯皮诺素; 掺伪; 鉴别

## Study on the identification of *Ziziphi Mauritiana* Semen in *Ziziphus Jujuba* Semen by high performance liquid chromatography

ZHANG Yanhui<sup>1</sup>, FU Pingping<sup>1</sup>, WANG An<sup>2</sup>, ZHANG Mingtong<sup>3</sup>, WANG Nan<sup>1</sup>, LI Jiagang<sup>1</sup>

Author Affiliations:<sup>1</sup>Baoding Institute for Food and Drug Control, Baoding, Hebei 071000, China; <sup>2</sup>Chizhou Institute of Quality Supervision and Inspection, Chizhou, Anhui 247100, China; <sup>3</sup>Gansu Institute for Drug Control(Gansu Inspection and Testing Technical Engineering Laboratory for Chinese Herbal and Tibetan Medicine, NMPA Key Laboratory for Quality Control of TCM), Lanzhou, Gansu 730070, China

**Abstract Objective** To establish a high-performance liquid chromatography (HPLC) method for determining the content of 6''-Sinapoylspinosin in sour jujube kernels and Li jujube kernels to identify adulterated Li jujube kernels in sour jujube kernels. **Methods** From December 2020 to December 2022, the content of 6''-sinapinol in sour jujube kernels and natural jujube kernels was analyzed and determined by HPLC method with Agela Venus ASB C18 column (4.6 mm × 200 mm, 5 μm), acetonitrile 0.2% glacial acetic acid aqueous solution was selected as the mobile phase gradient elution, detection wavelength was 335nm, Volume flow rate was 1.0mL/min, column temperature was 30 °C. **Results** There was a good linear relationship between 6''-sinapinyl spirinolactone in the range of 2.32-138.96 μg/L (r=1). The average sample recovery rate of jujube kernels was 97.5%, with a relative standard deviation (RSD) of 1.5%. The average sample recovery rate of sour jujube kernels was 97.8%, with an RSD of 1.7%. Its content range of sour jujube kernels was 0.003 3% to 0.005 1%, and the content range of natural jujube kernels was 0.050 6% to 0.066 0%. **Conclusion** The established HPLC method has high sensitivity, strong specificity, and good reproducibility, and can be used for the identification of adulterated jujube kernels in sour jujube kernels.

**Keywords** *Ziziphi Spinoso* Hu; Drug contamination; *Z.mauritiana* Lam; 6''-Sinapoylspinosin; Adulteration; Identify

酸枣仁收载于《中国药典》2020年版一部,来源为鼠李科植物酸枣 *Ziziphus jujuba* Mill. var. *spinosa* (Bunge) Hu ex H.F.Chou 的干燥成熟种子<sup>[1]</sup>,具有养心补肝,宁心安神,敛汗,生津的功效<sup>[2]</sup>。近年来酸枣仁药材资源紧缺,价格昂贵,质量参差不齐,掺伪现象频发。比较常见的有同科植物滇刺枣 *Ziziphus 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<sup>[3]</sup>。目前关于二者的掺伪研究很少,中国食品药品检定研究院刘薇等<sup>[4]</sup>在中药酸枣仁的真伪鉴别方法研究中报道过,酸枣仁与理枣仁在化学成分上有明显的差异,但未指出具体的化学成分。查阅相关文献<sup>[5-6]</sup>,成功提取出6''-芥子酰斯皮诺素,采用高效液相色谱法(HPLC)测定其含量,该成分在酸枣仁与理枣仁药材中的含量存在很大的差异,该方法灵敏度高、准确度好且易于推广,可有效解决酸枣仁掺伪理枣仁的问题。本研究起止时间为2020年12月至2022年12月。

### 1 仪器与试剂

**1.1 仪器** LC-2010A 高效液相色谱仪(日本岛津公司),BP211D型电子天平(精度为万分之一)[赛多利斯科学仪器(北京)有限公司],索式提取器(天津市北方玻璃仪器)。

**1.2 试剂、试药** 6''-芥子酰斯皮诺素对照品(第三方公司提纯,含量以94.8%计);乙腈(默克化工技术(上海)有限公司,批号11166230132)为色谱纯,

水(高碑店娃哈哈宏振食品饮料有限公司,批号3119GH)为超纯水,其他试剂均为分析纯;酸枣仁药材(10批次),理枣仁药材(10批次),经河北省药品医疗器械检验研究院段吉平主任药师鉴定,见表1。

表1 酸枣仁和理枣仁药材样品信息

酸枣仁批次	来源	理枣仁批次	来源
S1	东北	L1	安国市场
S2	河北	L2	安国市场
S3	山东	L3	安国市场
S4	山西	L4	安国市场
S5	河北	L5	安国市场
S6	济南	L6	安国市场
S7	陕西	L7	安国市场
S8	甘肃	L8	安国市场
S9	佛山	L9	安国市场
S10	东北	L10	安国市场

### 2 方法与结果

**2.1 色谱条件** 色谱柱:Agela Venusil ASB C18柱(4.6 mm×200 mm,5 μm);流动相:乙腈为流动相A,0.2%甲酸水溶液为流动相B,梯度洗脱条件见表2。检测波长:335 nm;柱温30 °C;流速1.0 mL/min;对照品溶液进样量:10 μL,供试品溶液进样量:20 μL;理论塔板数均不低于2 000。

**2.2 溶液的制备** 对照品溶液的制备:取对照品适

表2 梯度洗脱条件

时间/min	流动相 A/%	流动相 B/%
0~10	12→18	88→82
>10~16	18	82
>16~40	18→40	82→60
>40~50	40	60

量,精密称定,加甲醇制成每1毫升含0.2316 mg的溶液,作为对照品储备液。精密量取上述对照品储备液3毫升至10毫升量瓶中,加甲醇稀释并定容至刻度,摇匀,作为对照品溶液。

供试品溶液的制备:取本品粉末(过四号筛),精密称取2 g,置索氏提取器中,加石油醚(60~90 °C)80 mL,回流4 h,弃去石油醚液,药渣挥去溶剂,转移至锥形瓶中,精密加入70%乙醇50 mL,称定质量,回流2 h,放冷,再称定质量,加70%的乙醇补足减失的质量,摇匀,滤过,精密量取续滤液25 mL,回收溶剂至干,残渣加甲醇溶解,转移至10 mL量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,作为供试品溶液<sup>[7]</sup>。

**2.3 方法学考察** 线性关系考察:取对照品储备液逐级稀释得6个质量浓度水平的对照品稀释液,按“2.1”项下色谱条件测定,以对照品浓度为横坐标(X),峰面积积分为纵坐标(Y),绘制标准曲线,得到回归方程 $Y=187\ 507X+17\ 896$ ,线性范围为2.32~138.96  $\mu\text{g/L}$ ,相关系数( $r$ )=1,表明方法线性关系良好<sup>[8]</sup>。

精密度试验:精密吸取“2.2”项下同一对照品溶液10  $\mu\text{L}$ ,按“2.1”项下色谱条件连续进样6次测定,结果峰面积的相对标准偏差(RSD)为0.28%( $n=6$ ),表明仪器精密度良好<sup>[9]</sup>。

重复性试验:取同一批(批次为L9,S4)样品各6份,精密称定,按“2.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件进样分析,结果含量的RSD分别为1.51%、1.83%( $n=6$ ),表明方法重复性良好<sup>[10]</sup>。

定量限(LOQ)和检测限(LOD):将“2.2”项下的对照品溶液逐级稀释,并依次进样测定。按信噪比(S/N)=10计算,该方法测定6'''-芥子酰斯皮诺素的定量限为2.08  $\mu\text{g/L}$ ;按S/N=3计算,该方法测定6'''-芥子酰斯皮诺素的检测限为0.69  $\mu\text{g/L}$ 。

稳定性试验:将供试品溶液(批次为L9,S4)在0、1、2、4、8、16、24 h分别进样测定,结果峰面积的RSD为0.26%、0.33%( $n=7$ ),表明供试品溶液在24 h内稳定<sup>[11]</sup>。

加样回收试验:分别精密称取已知含量的理枣仁和酸枣仁(批次L9,S4)(过四号筛)1 g,分成两组,每组6份,分别精密加入定量的对照品储备液,按“2.1”项下色谱条件测定,并计算6'''-芥子酰斯皮诺素的加样回收率<sup>[12]</sup>。理枣仁回收试验结果见表3,酸枣仁回收实验结果见表4。

**2.4 样品含量测定** (1)取不同批次酸枣仁(S1~S10)及理枣仁(L1~L10)样品各2.0 g,精密称定,按“2.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算含量,结果见表5。

(2)取不同批次酸枣仁(S1~S10)分别加入理枣仁(L9),理枣仁占总质量的3%,取上述10份样品各2.0 g,精密称定,按“2.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算含量,结果见表6。

### 3 讨论

**3.1 提取方法的选择** 本方法是在《中国药典》2020年版一部酸枣仁含量测定方法的基础上加以改善而成。该方法通过定量加入70%乙醇,定量吸取滤液,可有效避免供试品溶液的损失,且该方法更简单、重现性好、回收率高。

**3.2 选取“酸枣仁3%掺伪样品”作为判定依据的理由** 《中国药典》2020年版四部0212药材和饮片检定通则规定:除另有规定外,饮片中药屑及杂质通常不得过3%,故选取“酸枣仁3%掺伪样品”作为判定依据。

**3.3 耐用性试验** 按照《中国药典》2020年版四部9101分析方法验证指导原则的要求,对方法的耐用性进行考察。首先,选用了3种品牌的色谱柱,分别为Agela Venusil ASB C18柱(4.6 mm×200 mm, 5  $\mu\text{m}$ )、ShimNex CS C18柱(4.6 mm×250 mm, 5  $\mu\text{m}$ )、Kromasil 100-5C18柱(4.6 mm×250 mm, 5  $\mu\text{m}$ ),结果不同色谱柱测定的6'''-芥子酰斯皮诺素含量差异

表3 理枣仁6'''-芥子酰斯皮诺素回收试验结果( $n=6$ )

取样量/g	样品含量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	相对标准偏差/%
1.004 0	0.578 3	0.463 2	1.022 3	99.35	97.5	1.5
1.001 2	0.576 7	0.463 2	1.031 3	98.14		
1.029 4	0.592 9	0.463 2	1.048 2	98.29		
1.060 4	0.610 8	0.463 2	1.051 6	95.16		
1.003 2	0.577 8	0.463 2	1.031 6	97.97		
1.012 8	0.583 4	0.463 2	1.041 7	98.94		

表4 酸枣仁6'''-芥子酰斯皮诺素回收试验结果(n=6)

取样量/g	样品含量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	相对标准偏差/%
1.010 0	0.051 5	0.051 4	0.102 9	100.00		
1.016 0	0.051 8	0.051 4	0.101 1	95.91		
1.019 3	0.052 0	0.051 4	0.102 0	97.28	97.8	1.7
1.018 8	0.052 0	0.051 4	0.101 4	96.11		
1.003 2	0.051 2	0.051 4	0.102 2	99.22		
1.012 8	0.05 7	0.051 4	0.102 1	98.05		

表5 酸枣仁和理枣仁样品测定6'''-芥子酰斯皮诺素结果/%

批次	来源	结果	批次	来源	结果
S1	东北	0.003 7	L1	安国市场	0.050 6
S2	河北	0.004 2	L2	安国市场	0.056 9
S3	山东	0.004 2	L3	安国市场	0.063 4
S4	山西	0.005 1	L4	安国市场	0.057 5
S5	河北	0.004 7	L5	安国市场	0.061 3
S6	济南	0.004 8	L6	安国市场	0.066 0
S7	陕西	0.004 0	L7	安国市场	0.058 9
S8	甘肃	0.003 6	L8	安国市场	0.064 2
S9	佛山	0.004 1	L9	安国市场	0.057 6
S10	东北	0.003 3	L10	安国市场	0.059 9
平均值		0.004 2	平均值		0.059 6

表6 酸枣仁3%掺伪样品(理枣仁)10份测定6'''-芥子酰斯皮诺素结果/%

批次	来源	结果	批次	来源	结果
S1	东北	0.005 9	S6	济南	0.006 4
S2	河北	0.006 2	S7	陕西	0.005 6
S3	山东	0.005 7	S8	甘肃	0.005 4
S4	山西	0.007 2	S9	佛山	0.006 4
S5	河北	0.005 9	S10	东北	0.005 0

注:10份样品中6'''-芥子酰斯皮诺素平均值为0.006 0%。

不大,RSD<2.0%。其次,选取了3个品牌的高效液相色谱仪,分别为岛津2010A<sup>HT</sup>、Agilent1260、Waters2695,结果不同仪器测得数据的RSD<1.5%。同时检测不同柱温,不同流量,不同流动相比比例,结果试验中测得的数据RSD<2.0%<sup>[13]</sup>。

**3.4 样品收集** 本次实验共收集到酸枣仁样品10批次<sup>[14]</sup>,产地覆盖东北、河北、山东、山西、陕西、甘肃等几大产区;理枣仁样品10次,经市场调研,目前理枣仁样品为越南进口品种,为了保证所用样品具有代表性,分批次从不同商户手中购买。

**3.5 结果判定** 经实验检测其在酸枣仁中含量范围为0.003 3%~0.005 1%,在理枣仁中含量范围为0.050 6%~0.066 0%,3%掺伪样品中含量范围为0.005 0%~0.007 2%。由上述数据可判定,当样品含量高于0.007 2%时,即可判定酸枣仁样品中掺有理枣仁。

**3.6 方法评价** 改进方法操作简单<sup>[15]</sup>,样品前处理

方便,准确性好,回收率高,可靠性强,成功率高,对酸枣仁的质量控制<sup>[16]</sup>具有一定科学价值,经初步研究,此方法可适用于胶囊剂中酸枣仁药材的掺伪鉴别,为中成药中酸枣仁掺伪鉴别奠定科学依据<sup>[17]</sup>。

### 参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:2015年版 一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2020:382-384.
- [2] 高明阳. 酸枣仁候选标准饮片制备技术规范研究[D]. 成都:成都中医药大学,2017.
- [3] 黄德耀. 从外观性状识别酸枣仁伪品[J]. 中国实用医药,2015,10(1):221-222.
- [4] 刘薇,李明华,余坤子,等. 中药酸枣仁的真伪鉴别方法研究[J]. 药物分析杂志,2015,35(9):1629-1634.
- [5] 申晨曦. 酸枣仁和理枣仁化学成分系统表征及对比研究[D]. 太原:山西大学,2020.
- [6] 王文斌,莫静,程华春,等. 多重连接探针扩增技术鉴别酸枣仁及混伪品的研究[J]. 中药材,2022,45(4):818-823.
- [7] 李尚茜,丰瑜,钱小晓,等. HPLC法测定八珍丸中5个成分的含量[J]. 中药材,2023,46(5):1232-1235.
- [8] 闫辉,高欢,崔清华,等. HPLC同时测定桑白皮中4种成分的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2017,23(5):53-56.
- [9] 刘群,邱少华,林晓. 仙灵骨颗粒质量标准的研究[J]. 药学研究,2019,38(9):520-524.
- [10] 何丽娜,程雅丽,刘春霞,等. 高效液相同时测定感冒疏风胶囊中9种成分的含量[J]. 中国处方药,2023,21(6):38-42.
- [11] 赵映兰,林彩,贺红军,等. 山楂药材中表儿茶素的提取及含量测定[J]. 中国药业,2009,18(12):34-35.
- [12] 张明童,刘东升,李冬华,等. 罂粟壳与罂粟壳水煎液中5个生物碱类成分的对比如研究[J]. 中药材,2021,44(9):2079-2084.
- [13] 刘晓明,崔晓燕,庞文哲,等. HPLC法同时测定枣仁安神胶囊中6种成分[J]. 中草药,2020,51(9):2467-2471.
- [14] 温子帅,李新蕊,木盼盼,等. 酸枣仁中斯皮诺素、酸枣仁皂苷A含量测定及其质量等级划分标准研究[J]. 中国药房,2019,30(20):2802-2807.
- [15] 周赛男,郭宝林. 简化样品处理快速测定酸枣仁中多种成分含量的研究[J]. 中国现代中药,2019,21(4):468-472.
- [16] 尹美玲,宋颜君,许利嘉,等. 酸枣仁的古今应用和热点变化的研究进展[J]. 中成药,2022,44(12):3949-3953.
- [17] 王爽,闫艳. 酸枣仁总黄酮的制备及质量控制研究[J]. 山西医科大学学报,2022,53(2):232-238.

(收稿日期:2023-01-31,修回日期:2023-12-15)