

市售酸棗仁藥材之鑑別及其成分含量測定

陳文惠 陳佩儀 劉宜祝 羅吉方

研究檢驗組

摘要

酸棗仁(*Ziziphi Spinosae Semen*)為常用中藥之一，中華中藥典收載之基原為鼠李科植物酸棗*Ziziphus jujuba* Mill. var. *spinosa* (Bunge) Hu ex H. F. Chou的乾燥成熟種子。大陸近年抽樣調查發現，市場近半數以上用其同屬植物滇棗仁*Z. mauritiana* Lam.種子混充酸棗仁使用，雖同為棗屬(*Ziziphus*)植物，但其外觀、組織及成分含量有明顯差異，應予區別。有鑑於此，本研究以生藥學、薄層層析法及極致效能液相層析法，建立酸棗仁及滇棗仁之鑑別方法，並進行市售本基原之鑑定。結果顯示，50件檢體中，32件(64%)為正品*Z. jujuba*，18件(36%)誤用，誤用品皆為滇棗仁，市售酸棗仁誤用情形嚴重，應詳加鑑別。

本實驗之極致效能液相層析法係採用Acquity BEH C₁₈ 2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm管柱，流動相為乙腈-水溶液，利用線性梯度沖提，檢測波長為203 nm。指標成分1. 酸棗仁皂苷A (jujuboside A)、2. 酸棗仁皂苷B (jujuboside B)及3. 斯皮諾素(spinosin)其線性迴歸方程式分別為1: $Y = 5.124X - 0.003$ ($r^2 = 0.9999$); 2: $Y = 6.151X - 0.0043$ ($r^2 = 0.9999$); 3: $Y = 57.642X - 0.022$ ($r^2 = 0.9999$)，呈良好線性關係。同日間(Intraday)相對標準偏差分別為1: 0.246-0.315%; 2: 0.228-0.788%; 3: 0.205-0.302%，異日間(Interday)相對標準偏差分別為1: 0.335-0.953%; 2: 0.190-0.853%; 3: 0.080-0.241%。市售32件酸棗仁藥材，利用上述極致效能液相層析法分析其含量，分別為1: 0.013-0.080%; 2: 0.002-0.063%; 3: 0.041-0.1040%間。

關鍵詞：酸棗仁、滇棗仁、UPLC、酸棗仁皂苷A、B (jujuboside A、B)、斯皮諾素 (spinosin)、鑑定、組織鑑別

前言

酸棗仁(*Ziziphi Spinosae Semen*)為常用中藥材，有養肝、寧心安神、斂汗生津功能，中醫臨床用於虛煩不眠、津少口乾^(1,2)，現代藥理研究顯示，酸棗仁有鎮靜催眠抗驚、鎮痛降溫⁽¹⁾等作用。其基原為鼠李科植物酸棗*Ziziphus jujuba* Mill. var. *spinosa* (Bunge) Hu ex H. F. Chou的乾燥成熟種子^(3,4)。大陸近年抽樣調查發現，市場近半數以上用其同屬植物滇刺棗*Ziziphus jujuba* Lam.種子混充酸棗仁使用，滇刺棗又稱滇棗仁、進口棗仁或緬棗仁，主產於大陸雲南地區和緬甸，雖同為棗

屬(*Ziziphus*)植物，但其外觀、組織及成分含量有明顯差異，應予區別。

根據文獻記載，酸棗仁種子扁圓，表面紫紅，較平坦一面中有一條隆起的縱線紋；滇棗仁種子扁圓近桃型，表面棕黃色，平坦面中間無明顯隆起的縱線紋，種皮較薄⁽⁵⁾；組織方面，酸棗仁種子子葉細胞間含草酸鈣簇晶，滇棗仁種子子葉細胞間難見草酸鈣晶體⁽⁶⁾，兩者可依此二特徵進行鑑別。酸棗仁主要成分為三萜皂苷、三萜類及黃酮類，包括酸棗仁皂苷A、B、B₁ (jujuboside A、B、B₁)⁽²⁾、斯皮諾素(spinosin)⁽¹⁾、白樺脂醇(Betulin)、酸棗仁鹼A (sanjoinine A)⁽¹⁾等；滇棗仁

在成分上並無相關文獻記載。

為確保酸棗仁用藥之正確性，防止偽品與代用品影響療效與安全，為執行本研究計畫分赴全國北、中、南區之藥廠及藥房價購酸棗仁藥材共50件，參照文獻之記載，經性狀特徵、組織鏡檢及薄層層析法鑑別，再以極致效能液相層析法(UPLC)分析檢測藥材中指標成分jujuboside A、B及spinosin之含量，研究結果將作為酸棗仁藥材管理依據，並提供相關行政管理單位制定成分含量之參考依據。

材料與方法

一、材料

(一)儀器與器具

1. 顯微鏡(Olympus: BX51)附影像處理裝置(Evolution/QImaging Digital Camera kit)
2. 實體顯微鏡(LEICA M205C)附影像處理裝置(LAS software/Montage/Interactive Measurement)
3. 旋轉式切片機(GA-340 ER rotary microtome)
4. 減壓真空烘箱(Forma Scientific; 6512 Vacuum Oven)
5. 真空馬達(Buchi Labortoriums-Technik AG CH-9230 FLAWIL/SCHWEIZ)
6. 加熱板(CAMAG Temp 20°C-220°C、Corning Hot Plate, USA)
7. 烘箱、固定瓶、軟木塞、超音波振盪器、展開槽
8. 薄層層析板(E. Merck; Silica gel 60 F₂₅₄, 20 x 20 cm)
9. TLC照像裝置(Gel Catcher)附數位照相機(Canon G1)

(二)試劑與對照標準品

1. 試劑：氫氧化鉀(Merck)、異丁醇(Kanto)、二甲苯(Lab-Scan)、無水酒精(Riedel deHaen)、冰醋酸(Alps)、過氧化氫(Santoku)、正丁醇(和光)均為試藥級。
2. 對照標準品：jujuboside A、B及spinosin

(純度皆為98%，TAUTO BIOTECH CO., LTD)、propyl paraben (Sigma Chemical Co., USA)。

(三)檢體

1. 標準對照藥材：標本室收集(1件)及99年度至大陸採購之酸棗仁(1件)及滇棗仁(1件)藥材。
2. 市售檢體：民國99年間於中藥廠價購19件，另以逢機取樣方式於台北(9件)、台中(10件)及高雄(12件)地區藥店價購，共計50件。

二、方法

(一)外觀性狀檢查：

檢視藥材檢體外觀形狀、大小、顏色、斷面及氣味。

(二)組織切片⁽⁷⁾：

藥材檢體先以5%氫氧化鉀溶液軟化，再依埋蠟製片法(Paraffin Method)依序經固定、脫水、滲蠟、埋蠟、切片、張貼切片、脫蠟後，以顯微鏡檢視。

(三)解離法⁽⁷⁾：

將藥材檢體置於裝有30%過氧化氫：水：冰醋酸(1：4：5，v/v)混合液之固定瓶內蓋緊，放置於約50°C烘箱內，解離至檢體為半透明狀或略帶白色，以水沖洗三次，每次間隔約兩小時，用探針挑出已解離之材料，置於載玻片上，蓋上蓋玻片，以顯微鏡檢視。

(四)薄層層析法：

1. 藥材檢品製備：

取藥材檢體粉末約2 g，加70%甲醇適量於超音波震盪器振盪30分鐘後過濾，定量至10 mL，供作檢液。

2. 對照標準品製備：

取對照標準品jujuboside A、B、spinosin各約1 mg，加70%甲醇適量於超音波震盪器振盪30分鐘，再以70%甲醇定量至5 mL，供作對照標準品溶液。

3. 分析條件：

點注量各約25 μL ，展開溶媒為正丁醇：
水：冰醋酸(7：2：1，v/v)混合液。展開
後將薄層層析板風乾，噴p-Anisaldehyde/
 H_2SO_4 spray reagent呈色，於105 $^\circ\text{C}$ 下加熱
5分鐘後觀察。

(五)極致效能液相層析法分析條件：

1. 藥材檢品製備：

取檢體粉末約0.5 g，加70%甲醇適量於超
音波震盪器振盪30分鐘，重複2次，過濾，
合併濾液，加適量內部標準品(propyl
paraben)，定量至10 mL，內標最終濃度
為20.24 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，供作檢液。

2. 對照標準品製備：

取對照標準品jujuboside A、B、spinosin及
內部標準品適量，以70%甲醇稀釋調配成
一系列濃度(表一)，以各對照標準品與內
部標準品波峰面積比為Y軸，對照標準品
之濃度為X軸，作圖並求出對照標準品曲
線之線性迴歸方程式($Y = mx + b$)及相關係
數。

表一、指標成分jujuboside A、B、spinosin濃度表

	指標成分濃度梯度($\mu\text{g}/\text{mL}$)					
jujuboside A	103.3	51.6	25.8	12.9	6.5	3.2
jujuboside B	70.7	54.4	27.2	13.6	6.8	3.4
spinosin	132.2	66.1	33.0	16.5	8.3	4.1

3. 分析條件：

3.1 儀器：Waters Acquity UPLC

3.2 層析管柱：Acquity UPLC[®] BEH C₁₈
1.7 μm ，內徑2.1 \times 100 mm

保護管柱：Acquity UPLC[®] BEH C₁₈
1.7 μm ，內徑2.1 \times 5 mm

3.3 檢測波長：203 nm

3.4 溫度：30 $^\circ\text{C}$

3.5 注入容量：2 μL

3.6 移動相：梯度沖提(A：0.01% H_3PO_4 ；
B： CH_3CN)

4. 對照標準品溶液同日內及異日間之試驗
於各對照標準品標準曲線之線性範圍內，

Time(mins)	分析條件		
	A	B	Flow v(mL/min)
0	84	16	0.3
3	81	19	0.3
5	80	20	0.3
9	63	37	0.3
13	60	40	0.3
14	0	100	0.3
14.1	84	16	0.3
15	84	16	0.3

對照標準品溶液jujuboside A選擇51.6、
25.8、6.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ；jujuboside B選擇54.4、
27.2、6.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ；spinosin選擇66.1、
33.0、8.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，於同一天重複注入
UPLC分析5次，不同的5天重複注入UPLC
分析，每次注入2 μL ，將所得之數據(peak
area ratio)計算標準偏差(standard deviation)
與相對標準偏差(relative standard
deviation)。

結果與討論

一、藥材外觀及組織鑑別鑑別

酸棗仁(*Z. jujuba*)種子扁圓形，表面呈紫紅
色，一面較平坦，平坦面中間有一條隆起的縱
線紋，種皮較厚，切面較緊實、不易散落；滇
棗仁(*Z. mauritiana*)種子外型扁圓近桃型，
表面棕黃色，多有紫紅色斑紋，平坦的一面
中間無明顯隆起的縱線紋，種皮較薄，切面
較鬆散、易散落(圖一)；組織方面，酸棗
仁種子子葉細胞間含草酸鈣簇晶，多分布於
子葉細胞周圍，形成環狀；滇棗仁種子子
葉細胞間難見草酸鈣晶體(圖二)，依此二
特徵進行鑑別，市售50件檢體中18件為滇
棗仁種子。上述特徵皆與文獻資料^(1,2,5,6)
相符，惟酸棗仁結晶分布在本計劃藥材中
多見於子葉細胞周圍，而文獻指出結晶僅
分布於子葉細胞外側⁽¹⁾。

二、薄層層析法及極致效能液相層析法

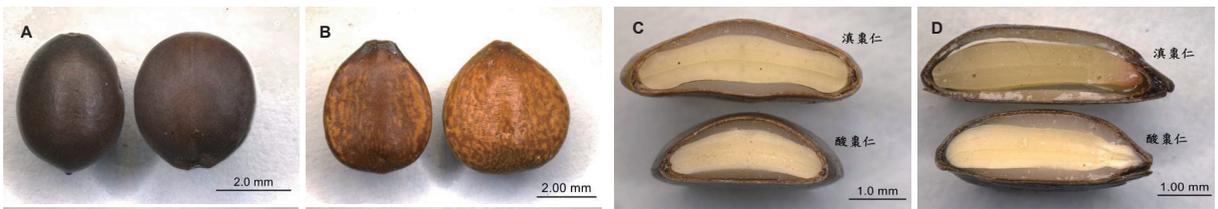
(一)薄層層析法

本實驗在外觀及組織鑑定後，以薄層層析及極致效能液相層析法分析並測其含量。薄層層析圖顯示，以正丁醇：水：冰醋酸(7：2：1，v/v)混合液展開以p-Anisadehyde/H₂SO₄呈色加熱後，滇棗仁在R_f 0.65處有淡藍色斑點，酸棗仁則無；在R_f 0.23、0.35、0.44處與jujuboside A、B及spinosin，酸棗仁與滇棗仁皆有黃色及藍色相對應斑點(圖三)。

(二)分析藥材中指標成分(spinosin、jujuboside A、B)含量

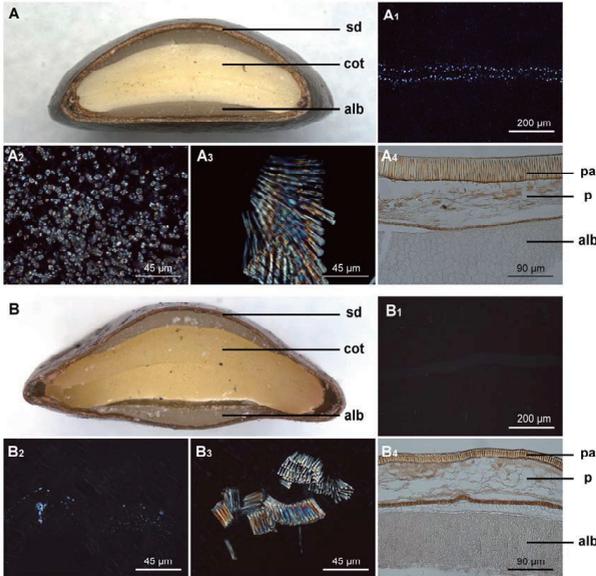
中華中藥典無明確規範酸棗仁藥材指標成分含量測定法⁽³⁾，但在中華人民共和國藥典規定酸棗仁藥材中jujuboside A含量不得少於0.030%、spinosin含量不得少於0.080%⁽⁴⁾，本計畫以spinosin、jujuboside A、B為酸棗仁藥材之指標成分，進行以下實驗。

極致效能液相層析利用磷酸水-乙腈做線性梯



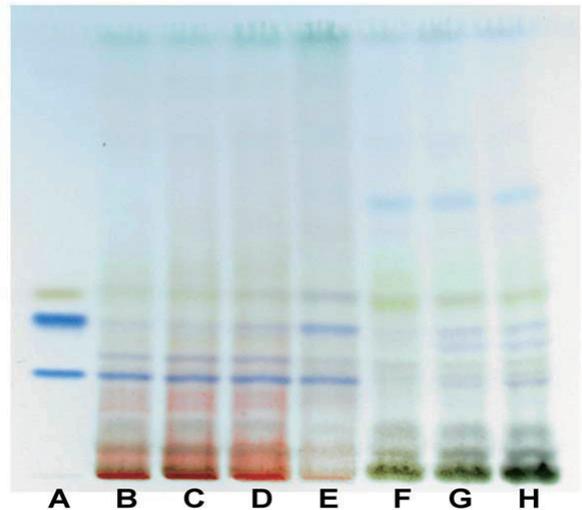
圖一 酸棗仁及滇棗仁對照藥材外觀及橫、縱切面圖

A 酸棗仁對照藥材外觀；B 滇棗仁對照藥材外觀；C 對照藥材橫切面圖；D 對照藥材縱切面圖



圖二、酸棗仁及滇棗仁對照藥材橫切面組織及解離圖

A. 酸棗仁對照藥材橫切面(A₂、A₃ 解離圖；A₁、A₄組織圖)A₁、A₂草酸鈣結晶(偏光檢視)；A₃種皮柵狀組織(偏光檢視)；A₄種皮組織
B. 滇棗仁對照藥材橫切面(B₂、B₃解離圖；B₁、B₄組織圖)B₁、B₂草酸鈣結晶(偏光檢視)；B₃種皮柵狀組織(偏光檢視)；B₄種皮組織



圖三、酸棗仁及滇棗仁對照藥材薄層層析圖譜

A. 指標成分(spinosin、jujuboside A、B)；B.-E. 酸棗仁對照藥材；F.-H. 滇棗仁對照藥材

略字表

Alb: albumen 胚乳
cot: cotyledon 子葉
p: parenchyma 柔組織
pa: palisade parenchyma 柵狀細胞組織
sd: seed coat 種皮

度沖提，指標成分spinosin(3)、jujuboside A(1)、B(2)分別在滯留時間3.2、10.7及12分鐘時檢出，線性迴歸方程式分別為1: $Y = 5.124X - 0.003$ ($r^2 = 0.9999$); 2: $Y = 6.151X - 0.0043$ ($r^2 = 0.9999$); 3: $Y = 57.642X - 0.022$ ($r^2 = 0.9999$)，呈良好線性關係，同日間(Intraday)相對標準偏差為1: 0.246-0.315%; 2: 0.228-0.788%; 3: 0.205-0.302%，異日間(Interday)相對標準偏差分別為1: 0.335-0.953%; 2: 0.190-0.853%; 3: 0.080-0.241%。市售32件酸棗仁藥材，利用上述極致效能液相層析法分析其含量，分別為1: 0.013-0.080%; 2: 0.002-0.063%; 3: 0.041-0.104%間(表二)。

32件市售酸棗仁藥材，利用前述分析法分析，其指標成分含量分別介於1: 0.013-0.080%; 2: 0.002-0.063%; 3: 0.041-0.104%; 18件誤用品滇棗仁藥材指標成分含量分別為1: 0-0.015%; 2: 0.003-0.018%; 3: 0.062-0.172%(表三)。層析結果顯示酸棗仁所含皂苷類成分(jujuboside A、B)較高，而滇棗仁所含黃酮類成分(spinosin)較高(圖五)，兩者指紋圖譜在滯留時間14分鐘時有明顯不同

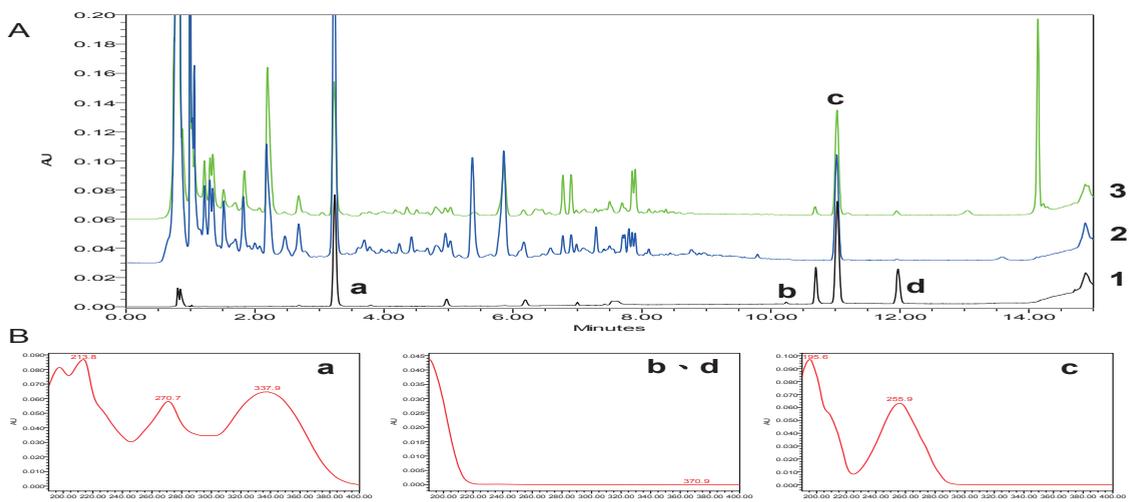
(圖四)，此分析法可快速鑑定藥材真偽且可精確檢出藥材中spinosin、jujuboside A、B含量。

表二、檢量線線性迴歸方程式與標準品同日、異日間精密度試驗

	線性迴歸方程式 (相關係數)	R.S.D (%)	
		同日間	異日間
jujuboside A	$Y = 5.124X - 0.003$ ($r^2 = 0.9999$)	0.246-0.315	0.335-0.953
jujuboside B	$Y = 6.151X - 0.004$ ($r^2 = 0.9999$)	0.228-0.788	0.190-0.853
spinosin	$Y = 57.642X - 0.022$ ($r^2 = 0.9999$)	0.205-0.302	0.080-0.241

表三、市售酸棗仁、滇棗仁藥材中指標成分(jujuboside A、B及spinosin)濃度(%) (n = 3)

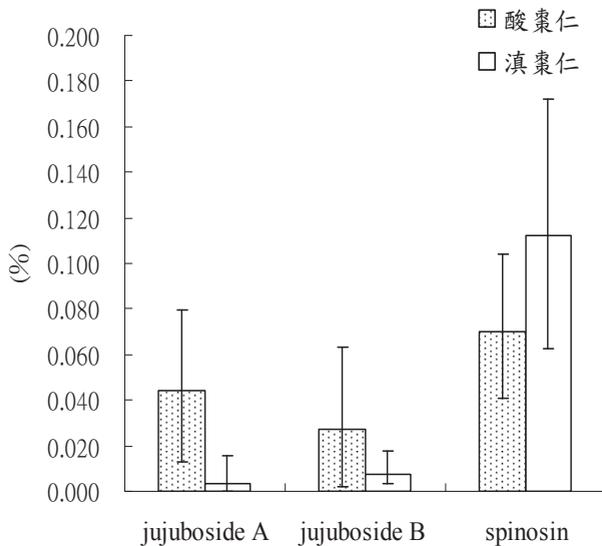
	jujuboside A (%)	jujuboside B (%)	spinosin (%)
酸棗仁			
Range	0.013-0.080	0.002-0.063	0.041-0.104
Mean±S.D	0.044±0.003	0.027±0.005	0.009±0.005
滇棗仁			
Range	0.000-0.015	0.003-0.018	0.062-0.172
Mean±S.D	0.004±0.000	0.008±0.000	0.113±0.007



圖四、酸棗仁及滇棗仁對照藥材UPLC層析圖譜及指標成分與內部標準品UV圖

A. UPLC層析圖譜 1：指標成分及內部標準品(a-d)；2：酸棗仁對照藥材；3：滇棗仁對照藥材

B. 指標成分及內部標準品(a-d) UV圖 a. spinosin; b. jujuboside A; c. propyl paraben; d. jujuboside B



圖五、市售酸棗仁、滇棗仁藥材中指標成分(jujuboside A、B及spinosin)濃度(%)

結 論

本研究分別自中藥廠與中藥房價購酸棗仁檢體共50件，經性狀特徵、組織鏡檢與成分分析，並與對照藥材及文獻比對，其中32件(64%)為正品，18件(36%)誤用，誤用品皆為滇棗仁，市售

酸棗仁藥材誤用情形嚴重，應詳加鑑別。由研究結果建立酸棗仁及其誤用品滇棗仁之鑑別方法，可供本局及相關機關之業務執行、藥典之編修及藥廠或業界用藥之參考。

參考文獻

1. 蕭培根。2002。新編中藥志第二卷。第648-653頁。化學工業出版社，北京。
2. 張貴君、徐國鈞。1993。常用中藥鑑定大全。第890-892頁。黑龍江科學技術出版社，哈爾濱。
3. 行政院衛生署中華中藥典中藥集編修小組。2004。中華中藥典。第176頁。行政院衛生署，台北。
4. 國家藥典委員會。2010。中華人民共和國藥典第一部。第343-344頁。化學工廠出版社，北京。
5. 中國藥品生物製品檢定所、廣東省藥品檢定所。1997。中國中藥材真偽鑑別圖典(3)。第180-1819頁。廣東科技出版社，廣東。
6. 王盛民。2005。中藥材檢索鑑別手冊。第536頁。學苑出版社，北京。
7. 蔡淑華。1975。植物解剖學。第37-47頁。國立編譯館，台北。

Identification of *Ziziphi spinosae* Semen by Pharmacognosy and Determination of Atractylodin by UPLC

WEN-HUI CHEN, PEI-YI CHEN, YI-CHU LIU AND CHI-FANG LO

Division of Research and Analysis

ABSTRACT

The botanical origin of *Ziziphi spinosae* Semen is dried semen of *Ziziphus jujuba* Mill. var. *spinosa* (Bunge) Hu ex H. F. Chou. Because of the morphological similarities of *Ziziphus* species, alternatives and adulterants were found and reported in literatures. In order to identify the botanical origins of commercial *Ziziphi spinosae* Semen in Taiwan, 50 samples, purchased from market, were examined and compared with authentic materials by morphology, microscopy, thin layer chromatographic analysis and ultra performance liquid chromatography. Identification approaches were thus established in this study and applied to identify botanical origins of samples. The results showed that 32 of 50 samples (64%) were *Z. jujuba* and 18 samples (36%) were *Z. mauritiana*.

Jujuboside A, B and spinosin in crude drugs were examined by ultra performance liquid chromatography. Samples were analyzed on a 1.7 μm ACQUITY BEH C₁₈ reversed phase column with a gradient elution using various proportion of 0.01% H₃PO₄ and CH₃CN as mobile phase and monitored at 203 nm. Regression equations revealed the linear relationship with correlation coefficients of 0.9999 between the peak-area ratios of jujuboside A, B and spinosin to internal standard and concentrations in crude drugs. The relative standard deviations of jujuboside A(1) , B(2) and spinosin(3) ranged between 1: 0.246-0.315%; 2: 0.228-0.788%; 3: 0.205-0.302% (intraday) and 1: 0.335-0.953%; 2: 0.190-0.853%; 3: 0.080-0.241% (interday), respectively. The contents of the jujuboside A, B and spinosin in 32 crude *Z. jujuba* were 0.013-0.080%、0.002-0.063% and 0.041-0.1040%, respectively.

Key words: *Ziziphi spinosae* Semen, Jujuboside A, Jujuboside B, Spinosin, Chinese medicinal preparations, UPLC, *Ziziphus jujuba*, *Ziziphus mauritiana*