

## HPLC法测定注射用益气复脉(冻干)中五味子醇甲、五味子醇乙、当归酰戈米辛Q和当归酰戈米辛H

张艳惠<sup>1,2</sup>, 李海燕<sup>1,2</sup>, 岳洪水<sup>1,2\*</sup>, 鞠爱春<sup>1,2\*</sup>

1. 天津天士力之骄药业有限公司, 天津 300410

2. 天津市中药注射剂新技术企业重点实验室, 天津 300410

**摘要:** 目的 建立HPLC法同时测定注射用益气复脉(冻干)(YQFM)中五味子醇甲、五味子醇乙、当归酰戈米辛Q和当归酰戈米辛H 4种木脂素类成分的含量。方法 采用Phenomenex Luna 5u C<sub>18</sub> (2) 100A柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 以乙腈-0.05%磷酸水梯度洗脱, 体积流量1.0 mL/min, 柱温30 °C, 检测波长220 nm。进行专属性、线性关系、加样回收率、重复性、稳定性、耐用性、方法适用性考察。结果 4种木脂素成分在各自浓度范围内线性关系良好( $r > 0.999$ ); 加样回收率为93.09%、88.25%、90.69%、91.08%, RSD均小于2%; 重复性、稳定性、耐用性结果均符合要求; 选取21批YQFM样品进行含量测定, 方法适用性良好。结论 所建立的方法准确可靠, 可用于YQFM中五味子醇甲、五味子醇乙、当归酰戈米辛Q和当归酰戈米辛H 4种木脂素类成分的含量测定。

**关键词:** 注射用益气复脉(冻干); 五味子醇甲; 五味子醇乙; 当归酰戈米辛Q; 当归酰戈米辛H; 含量测定; 高效液相

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2021)11-2414-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2021.11.018

## HPLC simultaneous determination of contents of schizandrol A, gomisin A, angeloylgomisin Q, angeloylgomisin H in Yiqi Fumai Lyophilized Injection

ZHANG Yanhui<sup>1,2</sup>, LI Haiyan<sup>1,2</sup>, YUE Hongshui<sup>1,2</sup>, JU Aichun<sup>1,2</sup>

1. Tianjin Tasly Pride Pharmaceutical Co., Ltd., Tianjin 300410, China

2. Tianjin Key Laboratory of Advanced Technology Enterprise of TCM Injections, Tianjin 300410, China

**Abstract: Objective** To establish a method for the content determination of schizandrol A, gomisin A, angeloylgomisin Q, angeloylgomisin H of Yiqi Fumai Lyophilized Injection (YQFM) and to investigate the stability of methods. **Methods** The chromatographic separation was achieved on the Phenomenex Luna 5u C<sub>18</sub> column using acetonitrile-0.05% phosphoric acid water as mobile phase gradient elution, the flow rate was 1.0 mL/min, the column temperature was 30 °C, and the detection wavelength was 220 nm. Specificity, linear relationship, sample recovery, repeatability, stability, durability and applicability of the method were investigated. **Results** The linear range of the four lignans were good in their own ranges ( $r > 0.999$ ). The average recovery of the four lignans was 93.09%, 88.25%, 90.69% and 91.08%, RSD was less than 2%. The results of repeatability, stability and durability all meet the requirements. Select 21 batches of YQFM samples for content determination, and the applicability of method was good. **Conclusion** The established method was accurate and reliable and can be used for the determination of the four lignans in YQFM.

**Key words:** Yiqi Fumai Lyophilized Injection; schizandrol A; gomisin A; angeloylgomisin H; angeloylgomisin Q; content determination; HPLC

注射用益气复脉(冻干)(YQFM)是处方源于经典古方生脉散的冻干粉针制剂,由红参、麦冬、五味子3味中药组成,在临床上主要用于治疗冠心病劳

累型心绞痛及慢性心功能不全等心血管系统疾病<sup>[1-2]</sup>。根据《中药、天然药物注射剂基本技术要求》规定,在质量研究方面,注射剂中所含成分应基本

收稿日期: 2021-08-04

第一作者: 张艳惠(1988—),女,标准支持工程师,研究方向为药物制剂与中药注射剂质量标准研究。E-mail: tsl-zhangyanhui2015@tasly.com

\*共同通信作者: 鞠爱春(1973—),男,高级工程师,研究方向为中药注射剂工艺及质量控制。E-mail: juach@tasly.com

岳洪水(1975—),男,高级工程师,研究方向为中药注射剂工艺开发、质量研究及技术提升等。E-mail: yuehs@tasly.com。

清楚,为了提高产品质量,近年来很多学者对YQFM中所含的化学成分进行了大量的物质基础研究,以使结构明确部分达到60%以上,目前已经确定的化学成分包括红参药材中的三萜皂苷类、麦冬药材中的甾体皂苷类、五味子药材中的木脂素类、糖类以及其他类成分。

五味子为木兰科藤本植物的干燥成熟果实,习称“北五味子”,其药用价值极高,《神农本草经》中记载“五味子具有益气生津,安神宁心,退热敛汗。止呕住泻,宁嗽定喘等功效”,五味子主要含有木脂素、有机酸、多糖及挥发油等多种化学成分,其中木脂素是五味子中的主要活性物质,具有镇静催眠、保肝降酶等广泛的药理作用,据现代药物分子研究发现五味子木脂素类有五味子甲素、五味子乙素、五味子丙素、五味子醇甲、五味子醇乙、五味子酯甲、当归酰戈米辛H、戈米辛D等<sup>[3-6]</sup>。

在控制YQFM制剂质量时,目前的研究主要集中于五味子醇甲的含量高低,而未对发挥作用的其他木脂素的含量进行评价。张奇等<sup>[7]</sup>采用HPLC-峰面积归一法测定YQFM总木脂素含量,该木脂素的供试品溶液制备方法采用的是环己烷萃取法,环己烷刺激性气味较大且提取过程繁琐不易操作。本研究优化了供试品溶液的制备方法,建立了YQFM中五味子醇甲、五味子醇乙、当归酰戈米辛Q和当归酰戈米辛H的HPLC测定方法并进行了方法适用性考察,与该产品制剂质量控制中指纹图谱及五味子醇甲含量测定的供试品制备方法相统一,节约了资源,并且为注射剂再评价中“注射剂中所含成分应基本清楚”的要求提供相关数据支持。

## 1 材料

### 1.1 主要仪器

Waters e2695-2489型高效液相色谱仪(Waters公司);梅特勒-MS204S、XS105DU型电子分析天平(美国Mettler Toledo公司);Milli-Q型超纯水仪(美国Millipore公司)。

### 1.2 试剂与主要试剂

YQFM(批号20170327、20160408、20161014、20161016、20161102、20161103、20161105、20170501、20170505、20170512、20170604、20170702、20170810、20170919、20180103、20180201、20180305、20180306、20180502、20180507、20180601、20180611,天津天士力之骄药业有限公司);五味子醇甲对照品(批号110857-201714,质量分数99.9%,中国食品药品检定研究院);五味子醇乙对照品(批号w14-110121,

质量分数99.4%,天津一方科技有限公司);当归酰戈米辛Q(批号DST180522-890,质量分数98%)、当归酰戈米辛H(批号MUST-17092612,质量分数99.5%),均来源于成都德思特生物技术有限公司;甲醇(色谱纯,4 L/瓶,批号I844007630)、乙腈(色谱纯,4 L/瓶,批号JA039430),Merck公司;磷酸(色谱纯,批号20181015,天津市致远化学试剂有限公司)。

## 2 方法

### 2.1 色谱条件

色谱柱为Phenomenex Luna 5u C<sub>18</sub>(2) 100A柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);柱温30℃;体积流量1 mL/min;检测波长220 nm;进样体积10 μL;有机相为乙腈,水相为0.05%磷酸水,洗脱梯度见表1。

表1 洗脱梯度

Table 1 Gradient of elution

时间/min	乙腈/%	0.05%磷酸水/%
0	40	60
16	50	50
23	52	48
30	56	44
35	95	5
40	95	5
41	40	60
50	40	60

### 2.2 对照品溶液的制备

五味子醇甲对照品储备液:取五味子醇甲对照品适量,精密称定,加甲醇溶解并定量稀释制成约300 μg/mL的溶液。五味子醇乙对照品储备液:取五味子醇乙对照品适量,精密称定,加甲醇溶解并定量稀释制成约100 μg/mL的溶液。当归酰戈米辛Q对照品储备液:取当归酰戈米辛Q对照品适量,精密称定,加甲醇溶解并定量稀释制成约100 μg/mL的溶液。当归酰戈米辛H对照品储备液:取当归酰戈米辛H对照品适量,精密称定,加甲醇溶解并定量稀释制成约含100 μg/mL的溶液。

五味子醇甲、五味子醇乙、当归酰戈米辛Q和当归酰戈米辛H混合对照品溶液:分别精密吸取各对照品储备液适量,加甲醇稀释制成约30、3.0、2.0、2.5 μg/mL的混合对照品溶液。

### 2.3 供试品溶液的制备

取YQFM 1.3 g,精密称定,加30%甲醇溶液10 mL使溶解,通过ProElutTMPLS SPE柱(500 mg/

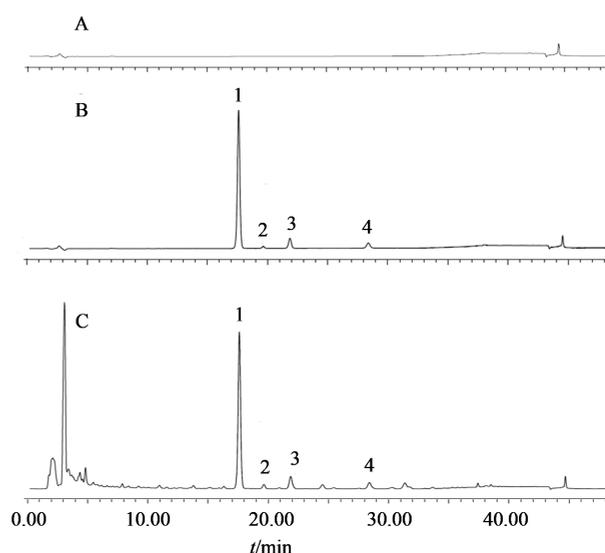
6 mL,预先依次用0.5 mol/L氢氧化钠溶液、0.1 mol/L盐酸溶液各10 mL洗脱,然后用水洗至洗脱液呈中性,再依次用甲醇、30%甲醇各10 mL洗脱,备用),体积流量约1 mL/min,弃去流出液,再依次用含0.5 mol/L的氢氧化钠的30%甲醇溶液2 mL、30%甲醇溶液5 mL洗脱,弃去流出液,最后用甲醇洗脱,收集甲醇洗脱液至5 mL量瓶中至近刻度,加甲醇稀释至刻度,摇匀,即得。

## 2.4 专属性实验

取空白溶剂(甲醇)、混和对照品溶液和供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件进行测定,色谱图见图1。空白溶剂对供试品测定无干扰,供试品溶液中五味子醇甲、五味子醇乙、当归酰戈米辛Q和当归酰戈米辛H分离度大于1.5,符合要求。

## 2.5 线性关系和范围

取“2.2”项下五味子醇甲、五味子醇乙、当归酰戈米辛Q和当归酰戈米辛H对照品储备液适量,加甲醇稀释,配制五味子醇甲质量浓度分别为75.185 0、60.184 0、30.074 0、15.037 0、12.029 6、6.014 8  $\mu\text{g/mL}$ ,五味子醇乙质量浓度分别为7.599 2、6.079 3、3.039 7、1.519 8、1.215 9、0.607 9  $\mu\text{g/mL}$ ,当归酰戈米辛Q质量浓度分别为4.762 8、3.810 2、1.905 1、0.952 6、0.762 0、0.381 0,当归酰戈米辛H质量浓度分别为6.979 7、5.583 7、2.791 9、1.395 9、1.116 7、0.558 4  $\mu\text{g/mL}$



1-五味子醇甲;2-当归酰戈米辛Q;3-五味子醇乙;4-当归酰戈米辛H  
1- schisandraol A; 2-angelicyl gomisine Q; 3-schisandraol B; 4-angelicyl gomisine H

图1 空白溶剂(A),混合对照品(B)和供试品(C)的HPLC图  
Fig. 1 HPLC chromatograms of blank control (A), mixed reference substances (B) and sample (C)

的混合对照品线性溶液。按照“2.1”项下的色谱条件进样分析,进样体积10  $\mu\text{L}$ ,记录峰面积,以峰面积对质量浓度进行线性回归,绘制标准曲线,得到各成分的回归方程及线性范围,见表2。五味子醇甲、五味子醇乙、当归酰戈米辛Q、当归酰戈米辛H 4个成分各自质量浓度范围内线性关系良好。

表2 线性关系考察

Table 2 Linear relationship evaluation results

化合物名称	线性方程	<i>r</i>	线性范围/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$
五味子醇甲	$Y=61\ 300 X+30\ 300$	0.999 8	6.014 8~75.185 0
五味子醇乙	$Y=59\ 800 X+24\ 100$	0.999 8	0.607 9~7.599 2
当归酰戈米辛Q	$Y=28\ 800 X+563$	0.999 9	0.381 0~4.762 8
当归酰戈米辛H	$Y=41\ 100 X+1\ 130$	0.999 8	0.558 4~6.979 7

## 2.6 加样回收率试验

取批号20170327的YQFM样品0.65 g置10 mL量瓶中,加入五味子醇甲、五味子醇乙、当归酰戈米辛Q和当归酰戈米辛H混合对照品溶液2.5 mL,加6.5%甲醇溶液稀释至刻度,按照“2.3”项下供试品溶液制备方法,平行制备6份,每份样品进2针,计算回收率和RSD值。五味子醇甲、五味子醇乙、当归酰戈米辛Q和当归酰戈米辛H的平均回收率分别为93.09%、88.25%、90.69%、91.08%,RSD值为0.8%、1.4%、1.5%、0.7%,符合要求。

## 2.7 重复性试验

取批号20170327的YQFM制剂样品,按照“2.3”项下方法制备供试品溶液,按照“2.1”项下色谱条件进行测定,考察分析重复性。将第一份供试品溶液连续进样6针,五味子醇甲、五味子醇乙、当归酰戈米辛Q和当归酰戈米辛H峰面积的RSD值分别为0.1%、0.2%、0.2%和0.2%,进样重复性符合要求,仪器精密度良好;平行6份供试品溶液4个成分含量RSD值分别为0.7%、1.0%、1.1%和0.8%,分析重复性符合要求。

## 2.8 稳定性试验

取批号20170327的YQFM制剂样品,分别按照“2.3”项下方法制备供试品溶液和“2.2”项下方法配制五味子醇甲、五味子醇乙、当归酰戈米辛Q和当归酰戈米辛H混合对照品溶液,分别在0、6、12、18、24、30 h按“2.1”项下色谱条件进样分析,计算供试品和对照品溶液中4个成分峰面积的RSD,考察供试品及对照品溶液的稳定性。30 h之内,供试品溶液中五味子醇甲、五味子醇乙、当归酰戈米辛Q和当归酰戈米辛H峰面积的RSD分别为0.2%、0.2%、1.0%和0.5%;对照品溶液中五味子醇甲、五味子醇乙、当归酰戈米辛Q和当归酰戈米辛H峰面积的RSD分别为0.5%、0.4%、0.4%和0.8%,说明30 h内供试品溶液及对照品溶液稳定性良好。

## 2.9 耐用性试验

取供试品溶液及五味子醇甲、五味子醇乙、当归酰戈米辛Q和当归酰戈米辛H混合对照品溶液,通过调整色谱柱(使用2根型号相同序列号不同的色谱柱),体积流量±10%(0.9、1.0、1.1 mL/min),柱温±10%(27、30、33 °C),调整水相磷酸的加入比例(0.01%、0.05%、0.10%)考察方法耐用性。不同色谱条件下,供试品和对照品溶液中4个目标峰分离度均大于1.5,峰纯度达到要求,方法耐用性良好。

## 2.10 含量测定

选取21批YQFM制剂,进行五味子醇甲、五味子醇乙、当归酰戈米辛Q、当归酰戈米辛H含量测定。21批制剂各目标成分含量测定结果见表3。

## 3 讨论

### 3.1 分析方法的确认

建立同时测定YQFM药品中4个木脂素类化合物含量的方法,实验过程中,分别考察了该产品日常检测常用的不同型号色谱柱Phenomenex Luna 5u C<sub>18</sub>(2) 100A柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)、Waters Symmetry C<sub>18</sub>色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)、Agilent ZORBAX Eclipse Plus C<sub>18</sub>(250 mm×4.6 mm, 5 μm)对4个化合物的分离度、峰对称性等影响,最后优选Phenomenex Luna 5u C<sub>18</sub>(2) 100A柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)进行测定。

方法建立过程中对色谱条件进行了优化,分别对水相中磷酸的浓度及有机相和水相的洗脱梯度进行了考察,根据目标峰的对称性、分离度等综合因素选择了最优的色谱条件。

此外,在供试品溶液制备过程中,药液上SPE小柱后,分别对上样后流出液、0.5 mol/L的氢氧化

表3 YQFM中总木脂素含量测定

Table 3 Determination of total lignans in YQFM injection

批号	五味子醇甲/(μg·g <sup>-1</sup> )	五味子醇乙/(μg·g <sup>-1</sup> )	当归酰戈米辛Q/(μg·g <sup>-1</sup> )	当归酰戈米辛H/(μg·g <sup>-1</sup> )	4个成分总和/(μg·g <sup>-1</sup> )
20160408	151.64	15.90	9.78	13.50	190.82
20161014	131.24	15.22	8.61	13.26	168.33
20161016	147.96	16.56	10.39	14.35	189.26
20161102	157.98	18.15	10.43	16.10	202.66
20161103	147.40	17.28	9.48	14.87	189.03
20161105	142.31	16.87	9.30	14.49	182.97
20170501	123.90	13.46	7.31	10.71	155.38
20170505	149.64	16.39	9.86	14.61	190.50
20170512	139.06	15.52	8.53	13.62	176.73
20170604	130.32	15.65	7.80	13.28	167.05
20170702	131.62	16.39	8.30	14.03	170.34
20170810	141.41	15.42	8.90	13.27	179.00
20170919	156.84	17.37	9.62	14.06	197.89
20180103	168.74	19.04	11.60	16.72	216.10
20180201	144.87	14.88	8.61	11.91	180.27
20180305	136.04	15.15	7.69	12.46	171.34
20180306	127.72	14.13	7.17	11.34	160.36
20180502	130.10	15.09	7.35	12.47	165.01
20180507	150.16	18.08	8.91	15.37	192.52
20180601	128.42	17.24	7.71	15.35	168.72
20180611	127.11	14.60	7.12	11.69	160.52

钠的30%甲醇溶液2 mL冲洗流出液、30%甲醇溶液5 mL分次冲洗流出液进行考察,测定弃去的流出液中是否有目标物的损失,结果均无损失。

基于优化后的测定方法,参考《中国药典》2020年版四部“通则9101”项下内容,对同时测定药液中4个成分的含量方法进行方法学验证,各评价指标符合现行标准<sup>[8]</sup>要求,证明药品中4个木脂素的含量测定方法可行,检测数据准确可靠。

### 3.2 方法适用性考察

本研究建立了HPLC同时测定YQFM中4个木脂素类化合物——五味子醇甲、五味子醇乙、当归酰戈米辛Q、当归酰戈米辛H的方法,并测定了不同年份共21批制剂中4个主要木脂素类化合物的含量,方法适用性良好,对21批数据进行了异常值检测,结果显示在5%显著性水平无差异,不同批次间木脂素成分含量差别不大,批间一致性良好。该方法准确、可靠、重复性好,可用于YQFM的质量评价。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 鞠爱春, 罗瑞芝, 苏小琴, 等. 注射用益气复脉(冻干)化学成分及质量控制研究进展 [J]. 药物评价研究, 2018, 41(3): 365-366.  
Ju A C, Luo R Z, Su X Q, et al. Research progress on chemical composition and quality control of Yiqi Fumai Lyophilized Injection [J]. Drug Eval Res, 2018, 41(3): 365-366.
- [2] 李德坤, 苏小琴, 李智, 等. 注射用益气复脉(冻干)的质量标志物研究 [J]. 中草药, 2019, 50(2): 290-298.  
Li D K, Su X Q, Li Z, et al. Study on quality marker of Yiqi Fumai Lyophilized Injection [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2019, 50(2): 290-298.
- [3] 魏雪苗, 侯建成, 刘洋, 等. 五味子木脂素研究进展 [J]. 吉林医药学院学报, 2018, 39(2): 115-116.  
Wei X M, Hou J C, Liu Y, et al. Research progress of *Schisandra* lignans [J]. J Jilin Med Univ, 2018, 39(2): 115-116.
- [4] 马艳春, 冯天甜, 韩宇博, 等. 五味子的化学成分和药理研究进展 [J]. 中医药学报, 2020, 48(11): 67-68.  
Ma Y C, Feng T T, Han Y B, et al. Research progress on the chemical constituents and pharmacology of *Schisandra* [J]. Acta Chin Med Pharm, 2020, 48(11): 67-68.
- [5] 林河炜, 刘泽润, 林虹敏, 等. 五味子木脂素的药理作用及其代谢途径和代谢产物研究进展 [J]. 特产研究, 2021, 43(5): 100-105.  
Lin H W, Liu Z R, Lin H M, et al. Research progress on pharmacological effects and metabolic pathways and metabolites of lignans from *Schisandra chinensis* [J]. Spec Wild Econ Anim Plant Res, 2021, 43(5): 100-105.
- [6] 任伟光, 张翠英. 五味子的研究进展及质量标志物(Q-marker)的预测分析 [J]. 中草药, 2020, 51(11): 3110-3116.  
Ren W G, Zhang C Y. Research progress of *Schisandra chinensis* and predictive analysis of Q-marker [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2020, 51(11): 3110-3116.
- [7] 张奇, 叶正良, 王薇单, 等. HPLC-峰面积归一法测定注射用益气复脉(冻干)中总木脂素的含量 [J]. 辽宁中医药杂志, 2011, 38(11): 2239-2241.  
Zhang Q, Ye Z L, Wang W D, et al. Determination of total lignans in Yiqi Fumai Lyophilized Injection by HPLC-peak area normalization method [J]. Liaoning J Tradit Chin Med, 2011, 38(11): 2239-2241.
- [8] 中国药典 [S]. 四部. 2020.  
Pharmacopoeia of the People's Republic of China [S]. Volume IV. 2020.

[责任编辑 兰新新]