

HPLC 法同时测定枣仁安神胶囊中 6 种成分

刘晓明, 崔晓燕, 庞文哲, 李晓平, 刘永利*

河北省药品检验研究院, 河北 石家庄 050011

摘要: **目的** 建立同时测定枣仁安神胶囊中五味子醇甲、五味子醇乙、隐丹参酮、丹参酮 I、丹参酮 II_A、五味子乙素的方法, 为枣仁安神胶囊的质量控制提供科学的方法。 **方法** 采用 HPLC 法, 选用 Thermo 120Å-C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 以乙腈-0.1%冰醋酸水溶液为流动相梯度洗脱, 对枣仁安神胶囊中 6 种主要指标性成分的含量进行同时分析测定; 检测波长: 五味子醇甲、五味子醇乙、五味子乙素为 250 nm, 隐丹参酮、丹参酮 I、丹参酮 II_A 为 270 nm; 体积流量 1.0 mL/min, 柱温为 30 ℃。 **结果** 五味子醇甲在 4.7~3 153.6 ng ($r=0.999\ 9$)、五味子醇乙在 7.864~314.500 ng ($r=0.999\ 9$), 隐丹参酮在 14.4~1 256.9 ng ($r=0.999\ 9$)、丹参酮 I 在 15.1~1 103.8 ng ($r=0.999\ 9$)、丹参酮 II_A 在 15.3~1 532.0 ng ($r=0.999\ 9$)、五味子乙素在 6.134~204.500 ng ($r=0.999\ 9$) 内呈良好的线性关系。平均加样回收率分别为五味子醇甲为 100.4%、五味子醇乙为 98.7%、隐丹参酮为 99.4%、丹参酮 I 为 100.0%、丹参酮 II_A 为 99.3%、五味子乙素 100.2%, RSD 分别为 1.4%、2.7%、2.2%、2.2%、2.5%、2.1%; 8 批样品中各指标成分的质量分数分别为五味子醇甲 1.545 7~1.909 9 mg/g、五味子醇乙 0.129 8~0.235 1 mg/g、隐丹参酮 0.508 4~0.523 4 mg/g、丹参酮 I 0.111 7~0.122 3 mg/g、丹参酮 II_A 0.755 8~0.874 4 mg/g、五味子乙素 0.120 2~0.190 1 mg/g。 **结论** 建立的含量测定分析方法灵敏度高、专属性强, 可很好地控制枣仁安神胶囊质量。

关键词: 枣仁安神胶囊; HPLC; 五味子醇甲; 五味子醇乙; 隐丹参酮; 丹参酮 I; 丹参酮 II_A; 五味子乙素; 质量控制

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2020)09-2467-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.09.022

Simultaneous determination of six index components analysis in Zaoren Anshen Capsules

LIU Xiao-ming, CUI Xiao-yan, PANG Wen-zhe, LI Xiao-ping, LIU Yong-li

Hebei Institute for Drug Control, Shijiazhuang 050011, China

Abstract: Objective To establish a method for determining the contents of schisandrin, schisandrol B, cryptotanshinone, tanshinone I and tanshinone II_A, γ -schisandrin in Zaoren Anshen Capsules (ZAC), and provide scientific method for quality control of ZAC. **Methods** HPLC was used by using Thermo 120Å-C₁₈ column, with the mobile phase consisted of acetonitrile and 0.1% acetic acid solution with gradient elution for simultaneous determination of six main index components. The detection wavelengths were set at 250 nm for schisandrin, schisandrol B, γ -schisandrin and 270 nm for cryptotanshinone, tanshinone I, and tanshinone II_A, flow rate was 1.0 mL/min, and column temperature was 30 ℃. **Results** Schisandrin, schisandrol B, γ -schisandrin, cryptotanshinone, tanshinone I, and tanshinone II_A showed good the linear ranges relationships in the range of 4.7—3 153.6 ng ($r=0.999\ 9$), 7.864—314.500 ng ($r=0.999\ 9$), 14.4—1 256.9 ng ($r=0.999\ 9$), 15.1—1 103.8 ng ($r=0.999\ 9$), 15.3—1 532.0 ng ($r=0.999\ 9$) and 6.134—204.500 ng ($r=0.999\ 9$), respectively. The average recoveries were 100.4%, 98.7%, 99.4%, 100.0%, 99.3% and 100.2%, RSD were 1.4%, 2.7%, 2.2%, 2.2%, 2.5% and 2.1%, respectively. The contents of each index component in 8 batches of sample were schisandrin 1.545 7—1.909 9 mg/g, schisandrol B 0.129 8—0.235 1 mg/g, cryptotanshinone 0.508 4—0.523 4 mg/g, tanshinone I 0.111 7—0.122 3 mg/g, tanshinone II_A 0.755 8—0.874 4 mg/g, γ -schisandrin 0.120 2—0.190 1 mg/g. **Conclusion** The established analytical method is highly sensitive with strong specificity and it can be used efficiently in the quality control of ZAC.

Key words: Zaoren Anshen Capsule; HPLC; schisandrin; schisandrol B; cryptotanshinone; tanshinone I; tanshinone II_A; γ -schisandrin; quality control

收稿日期: 2020-03-04

基金项目: 河北省自然科学基金-石药集团医药联合基金 (C2011320007)

作者简介: 刘晓明, 女, 主管药师, 从事中药分析专业。

*通信作者 刘永利, 男, 主任药师, 从事中药分析专业。Tel: (0311)85212004-8041 E-mail: liuyongli2008@126.com

枣仁安神胶囊 (Zaoren Anshen Capsules, ZAC) 主要由炒酸枣仁、丹参、醋五味子 3 味药材组成, 具有养血安神的作用, 用于心血不足所致的失眠、健忘、心烦、头晕, 神经衰弱症等^[1]。处方中用酸枣仁养心阴、益肝血以宁心安神; 丹参清心凉血、养血安神, 五味子滋肾养阴、益气生津, 三药合用, 具有补心养肝、安神益智、养血安神的作用; 用于心血不足所致的失眠、健忘、心烦、头晕; 神经衰弱症见上述证候者^[2]。目前, 对 ZAC 的质量控制多采用 HPLC 法对单一成分进行定量分析, 或对其某一味中药材进行质量分析^[3-5], 这些方法难以全面评价 ZAC 的质量^[6-7]。本实验以该品种中五味子醇甲、五味子醇乙、隐丹参酮、丹参酮 I 和丹参酮 II_A^[8-12]、五味子乙素^[13]这 6 种有效成分为质量控制基础, 同时建立了 6 种成分的含量测定方法。该方法准确、专属且重现性好, 为 ZAC 的质量控制提供了科学依据。

1 仪器与材料

Agilent 1260 型高效液相色谱仪, 检测器为 DAD 检测器, 美国 Agilent 公司; Thermo 120Å-C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 美国 Thermo 公司; AE240 电子天平, 瑞士 Mettler 公司; KQ-400KDE 超声仪, 昆山市超声仪器有限公司; Integral10 超纯水仪, 德国 Millipore 公司。

对照品五味子醇甲 (批号 110857-201211)、五味子醇乙 (批号 MUST-15070312)、隐丹参酮 (批号 110852-200806)、丹参酮 I (批号 110766-201205)、丹参酮 II_A (批号 110766-200619)、五味子乙素 (批号 110765-201210), 以上对照品除五味子醇乙素由中国科学院成都生物研究所提供, 其他均由中国食品药品检定研究院提供, 且对照品质量分数均在 95% 以上。ZAC, 批号 13001、13002、13003、13004、13005、13006、13007、13008。乙腈为色谱纯, 水为纯化水, 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件与系统适用性实验

色谱柱: Thermo 120Å-C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-0.1%冰醋酸水溶液, 梯度洗脱: 0~20 min, 48%~35%乙腈; 20~70 min, 35%~80%乙腈; 体积流量 1.0 mL/min; 进样量 10 μL; 检测波长: 250 nm 为五味子醇甲、五味子醇乙、五味子乙素含量测定波长, 270 nm 为隐丹参酮、丹参酮 I、丹参酮 II_A 含量测定波长; 柱温为 30 °C。在上

述色谱条件下, 各色谱峰的分离度均大于 1.5, 色谱图见图 1。

2.2 对照品溶液的制备

精密称取五味子醇甲对照品 10.53 mg、五味子醇乙对照品 6.553 mg、隐丹参酮 12.88 g、丹参酮 I 11.05 mg、丹参酮 II_A 对照品 19.15 g、五味子乙素对照品 5.112 mg, 分别置 50 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 作为对照品储备液。分别精密量取五味子醇甲、五味子醇乙、五味子乙素对照品储备液各 3 mL, 置 25 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 即得混合对照品溶液 I; 分别精密量取隐丹参酮、丹参酮 I 储备液各 3 mL, 丹参酮 II_A 对照品储备液 1 mL, 置 25 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 即得混合对照品溶液 II。

2.3 供试品溶液的制备

取样品 10 粒内容物, 混匀, 研细, 取约 1 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 70%甲醇 50 mL, 密塞, 称定质量, 超声处理 (功率 500 W, 频率 40 kHz) 30 min (必要时需摇散药粉), 放冷, 再称定质量, 用 70%甲醇补足减失的质量, 摇匀, 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得供试品溶液。

2.4 阴性溶液的制备

按处方比例和制法分别制备不含五味子和丹参的阴性样品, 按“2.3”方法制备阴性样品溶液。

2.5 线性关系考察

分别取五味子醇甲、五味子醇乙、隐丹参酮、丹参酮 I、丹参酮 II_A、五味子乙素对照品储备液逐级稀释得 7 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, 分别以各对照品进样量为横坐标 (X), 峰面积积分值为纵坐标 (Y), 绘制标准曲线, 回归方程及线性范围分别为五味子醇甲 $Y=3.48 \times 10^4 X+7.9 \times 10^4$, $r=0.999\ 9$, 线性范围 3.150~315.047 μg/mL; 五味子醇乙 $Y=2.16 \times 10^4 X+6.38 \times 10^4$, $r=0.999\ 9$, 线性范围 3.145~314.512 μg/mL; 隐丹参酮 $Y=7.78 \times 10^4 X+2.34 \times 10^5$, $r=0.999\ 9$, 线性范围 1.438~125.693 μg/mL; 丹参酮 I $Y=8.15 \times 10^4 X+1.97 \times 10^5$, $r=0.999\ 9$, 线性范围 1.512~110.381 μg/mL; 丹参酮 II_A $Y=9.46 \times 10^4 X+1.74 \times 10^5$, $r=0.999\ 9$, 线性范围 1.532~153.201 μg/mL; 五味子乙素 $Y=1.32 \times 10^4 X+5.89 \times 10^4$, $r=0.999\ 9$, 线性范围 3.013~20.453 μg/mL。

2.6 专属性考察

分别取混合对照品、供试品、阴性对照溶液各

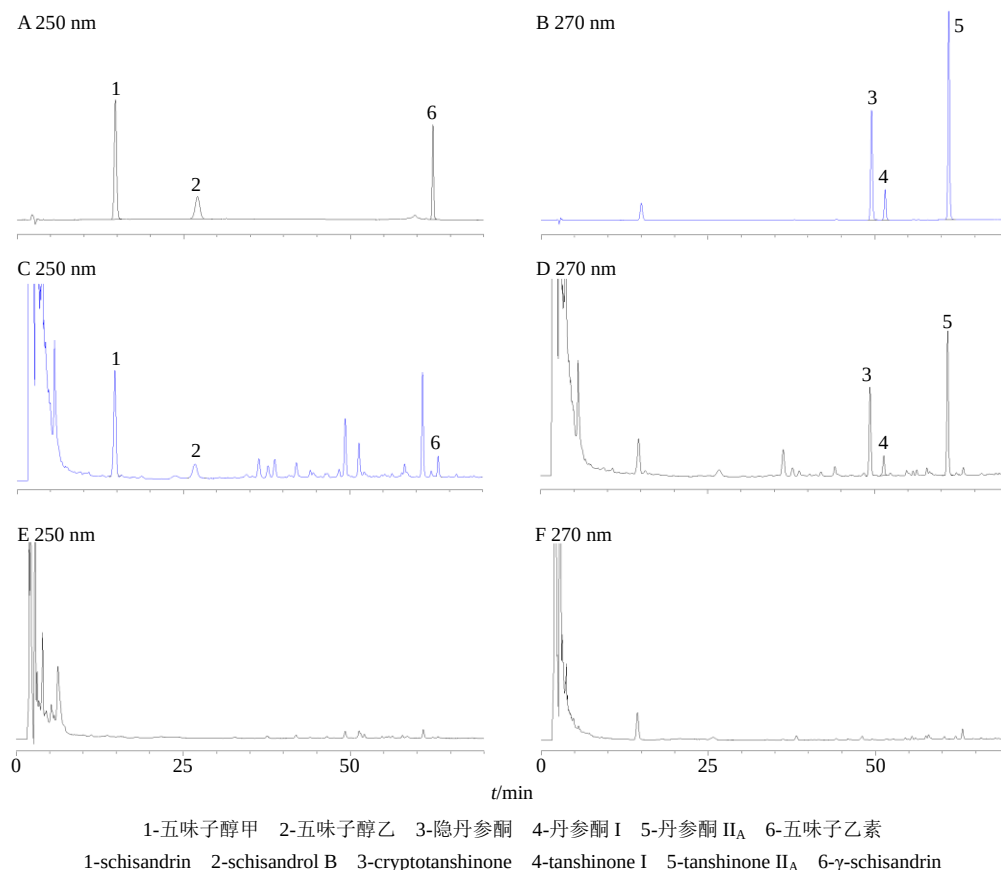


图 1 混合对照品 (A、B), ZAC 供试品 (C、D) 及不含五味子对照色谱图 (E)、不含丹参对照色谱图 (F)

Fig. 1 HPLC of mixed reference substances (A, B), ZAC sample (C, D) and negative samples without *Schisandra chinensis* (E), *Salvia miltiorrhiza* (F)

10 μ L, 按“2.1”项下色谱条件测定, 记录色谱图、结果阴性对照色谱中, 在与对照品溶液中五味子醇甲、五味子醇乙、隐丹参酮、丹参酮 I、丹参酮 II_A、五味子乙素保留时间对应位置上无色谱峰, 表明方中其他成分不干扰以上 6 种有效成分的测定(图 1)。

2.7 精密度试验

取混合对照品溶液, 连续进样 6 次, 记录峰面积值。结果五味子醇甲、五味子醇乙、隐丹参酮、丹参酮 I、丹参酮 II_A、五味子乙素峰面积 RSD 依次为 0.6%、0.8%、0.5%、0.8%、0.9%、0.7%, 表明仪器精密度良好。

2.8 重复性试验

取样品 (批号 13001) 9 份, 取样量分别为 0.5、1.0、1.5 g, 各 3 份, 精密称定, 按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件测定含量, 结果五味子醇甲、五味子醇乙、隐丹参酮、丹参酮 I、丹参酮 II_A、五味子乙素平均质量分数分别为 1.590 0、0.135 6、0.520 8、0.120 4、0.761 3、0.102 3 mg/g, RSD 分别为 1.4%、1.6%、1.8%、1.9%、1.3%、1.4%,

表明该方法重复性良好。

2.9 加样回收率试验

精密称取已知含量的 ZAC 样品 (批号 13001) 0.5 g, 共取 9 份分成 3 组, 每组 3 份, 分别精密加入高、中、低质量浓度的对照品溶液, 按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件测定含量。每组样品精密加入质量浓度分别为五味子醇甲 395.2 μ g/mL、五味子醇乙 35.0 μ g/mL、隐丹参酮 128.4 μ g/mL、丹参酮 I 31.5 μ g/mL、丹参酮 II_A 191.5 μ g/mL、五味子乙素 25.6 μ g/mL 的对照品溶液 1、2、3 mL, 结果五味子醇甲、五味子醇乙、隐丹参酮、丹参酮 I、丹参酮 II_A、五味子乙素平均加样回收率分别为 100.4%、98.7%、99.4%、100.0%、99.3%、100.2%, RSD 分别为 1.4%、2.7%、2.2%、2.2%、2.5%、2.1%。

2.10 稳定性考察

取同一供试品溶液, 分别于 0、2、7、9、24 h 进样测定分析, 结果显示五味子醇甲、五味子醇乙、隐丹参酮、丹参酮 I、丹参酮 II_A、五味子乙素峰面

积 RSD 分别为 0.9%、0.6%、0.7%、0.8%、0.6%、0.5%，均小于 1%，表明室温下样品溶液在 24 h 内稳定。

2.11 样品含量测定

取 8 批样品，分别按“2.3”项下方法制备供试品溶液，按“2.1”项下色谱条件测定五味子醇甲、五味子醇乙、隐丹参酮、丹参酮 I、丹参酮 II_A、五

味子乙素质量分数，结果见表 1。结果发现 8 批样品中各指标成分的质量分数分别为五味子醇甲 1.545 7~1.909 9 mg/g、五味子醇乙 0.129 8~0.235 1 mg/g、隐丹参酮 0.508 4~0.523 4 mg/g、丹参酮 I 0.111 7~0.122 3 mg/g、丹参酮 II_A 0.755 8~0.874 4 mg/g、五味子乙素 0.120 2~0.190 1 mg/g，表明不同批次样品中各成分质量分数差别较小，质量稳定。

表 1 样品测定结果 (n = 4)

Table 1 Results of samples determination (n = 4)

批号	质量分数/(mg·g ⁻¹)					
	五味子醇甲	五味子醇乙	隐丹参酮	丹参酮 I	丹参酮 II _A	五味子乙素
13001	1.545 7	0.226 7	0.509 3	0.119 5	0.764 4	0.157 8
13002	1.785 2	0.232 0	0.512 2	0.120 6	0.807 2	0.180 1
13003	1.900 0	0.234 1	0.516 4	0.122 3	0.874 4	0.185 8
13004	1.877 3	0.231 5	0.508 4	0.119 7	0.812 0	0.186 5
13005	1.909 9	0.235 1	0.519 7	0.121 8	0.829 6	0.190 1
13006	1.907 8	0.234 1	0.515 9	0.118 3	0.795 5	0.183 8
13007	1.902 0	0.234 2	0.523 4	0.118 7	0.787 3	0.186 4
13008	1.568 5	0.129 8	0.510 5	0.111 7	0.755 8	0.120 2

3 讨论

3.1 提取条件的选择

比较了以 50%、70%、100% 甲醇等不同提取溶剂及提取时间对结果的影响，结果以 70% 甲醇为溶剂，超声处理 30 min 样品分离度最好且含量最高。

3.2 流动相的选择

样品处方中药味成分复杂，经查阅文献及反复试验，确定以梯度为洗脱条件^[14]。为了较快将样品中杂质峰与五味子醇甲峰分离，洗脱中乙腈采用先由高体积分数到低体积分数即 48%~35%，然后又逐渐升高体积分数到 80% 的分析方法，该方法能够缩短样品有效成分的分析时间，从而节省分析成本。实验中曾尝试以纯水作为水相，结果基线噪音较高，经实验将纯水水相改为 0.1% 冰醋酸溶液后基线较平稳，样品峰与杂质峰的分离度更好。

3.3 测定波长的选择

因同时测定 6 个成分，选取检测波长时，通过紫外扫描使用二极管阵列检测器在 200~400 nm 范围内扫描光谱^[15-16]，结果五味子醇甲、五味子醇乙、五味子乙素的吸收波长在 250 nm，因此选择 250 nm 作为以上 3 种成分的测定波长；隐丹参酮、丹参酮 I、丹参酮 II_A 的最大吸收波长均在 270 nm^[17-18]，因此选择 270 nm 作为这 3 种成分的测定

波长，结果各待测成分峰与杂质峰分离良好。

3.4 耐用性试验

为了使该方法在应用时不受设备及色谱柱品牌的限制，在多种条件下进行了试验。首先选用了不同品牌色谱柱 Thermo 120Å-C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm)、Phelomon C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm)、Shiseido Capcell Pak C₁₈ MG II (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 进行考察，结果不同色谱柱测定的五味子醇甲、五味子醇乙、隐丹参酮、丹参酮 I 和丹参酮 II_A、五味子乙素含量进行比较，各有效成分的 RSD 值均小于 2%。

同时考察了 Ultimate 3000、Shimadzu LC20A、Agilent 1260、Waters 2695 4 个品牌的高效液相，结果不同设备间测定的上述 6 种成分含量 RSD 值均小于 2.5%。不同色谱条件考察，即不同 pH 值、不同体积流量、不同流动相比比例、不同柱温试验中得到上述 6 种成分含量的 RSD 值分别为 1.0%、1.8%、0.9%、1.2%。通过以上数据可以看出，该方法耐用性较好。

在本实验中曾尝试将酸枣仁与丹参、五味子的有效成分在同一色谱条件中分析，但由于酸枣仁中有效成分斯皮诺素等的极性与丹参、五味子的有效成分相差较大，且酸枣仁皂苷 A 在 DAD 检测器中

响应较低需要采用蒸发光检测器^[19-22], 所以很难在普通高效液相色谱仪中同时分析, 关于该品种的酸枣仁有效成分分析将在后面的研究中继续探讨。

参考文献

- [1] 康英梅. 枣仁安神胶囊联合唑吡坦治疗失眠症的临床研究 [J]. 现代药物与临床, 2019, 34(10): 2961-2965.
- [2] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [3] 许慧君, 吉祥, 张兰桐, 等. 高效液相色谱法同时测定枣仁安神胶囊中 7 种木脂素类成分 [J]. 中成药, 2011, 33(9): 1528-1531.
- [4] 冯华, 张超云, 邹孔强. HPLC 色谱法测定枣仁安神片中五味子醇甲的含量 [J]. 中医药导报, 2009, 15(1): 82-83.
- [5] 高家荣, 魏良兵, 韩燕全, 等. 复方枣仁安神胶囊质量控制研究 [J]. 中国中医药信息杂志, 2010, 17(7): 57-59.
- [6] 胡汉昆, 刘薇芝, 刘萍, 等. 中药特征图谱技术在中药鉴定中的应用 [J]. 中国医院药学杂志, 2009, 29(11): 936-938.
- [7] 张颖, 张起辉, 王光函, 等. 枣仁安神颗粒指纹图谱的相关性研究 [J]. 沈阳药科大学学报, 2010, 27(10): 825-828.
- [8] 吴春霞, 樊晨星, 王秀艳, 等. 丹参酮 II_A 对乳腺癌细胞阿霉素化疗敏感性的影响及相关机制研究 [J]. 中草药, 2019, 50(7): 1657-1663.
- [9] 苏梅, 秦引林, 娄雅静, 等. 丹参酮 II_A 磺酸钠体内外促血管新生作用的研究 [J]. 现代药物与临床, 2019, 34(4): 934-940.
- [10] 冯军鹏, 梁梅芳, 王有恒, 等. 丹参酮 II_A 磺酸钠联合重组人脑利钠肽治疗心肌梗死的效果、心功能改善情况和预后 [J]. 药物评价研究, 2019, 42(8): 1576-1579.
- [11] 王松, 汪茂胜, 周定荣, 等. 丹参酮 II_A 聚乙二醇-聚己内酯纳米胶束的制备、细胞内分布及减少心肌缺血再灌注损伤的研究 [J]. 中草药, 2020, 51(8): 2141-2150.
- [12] Yang P, Jia Y H, Li J, et al. Anti-oxidation of tanshinone II_A and prohibitin on cardiomyocytes [J]. *Chin Herb Med*, 2010, 2(3): 204-210.
- [13] 田妮, 谭小月, 张大宁, 等. 五味子乙素对顺铂损伤 HK-2 细胞 P21 和 Caspase-3 表达的影响 [J]. 中草药, 2017, 48(5): 951-956.
- [14] 张英丰, 朱黎霞, 梁东辉. HPLC 法同时检测丹参提取物中 5 种水溶性和脂溶性成分含量 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(11): 78-81.
- [15] 赵锦花, 王治国, 张小勇. 固相萃取高效液相色谱法同时测定五仁醇浸膏中的 5 种木脂素 [J]. 延边大学学报, 2011, 37(2): 152-155.
- [16] 舒可成, 刘洁. HPLC 测定枣仁安神液中的五味子醇甲 [J]. 药物分析杂志, 2012, 32(8): 1414-1416.
- [17] 郭风雪, 石晓霞. HPLC 法测定复方决明片中丹参酮 II_A 的含量 [J]. 河北师范大学学报: 自然科学版, 2005, 29(6): 597-599.
- [18] 李炜, 魏玉辉. 高效液相色谱法同时测定复方丹参片 6 种活性成分含量 [J]. 西部中医药, 2012, 25(6): 23-25.
- [19] 程匀. HPLC 法测定枣仁安神颗粒中酸枣仁皂苷 A 的含量 [J]. 湖南中医杂志, 2009, 27(4): 119-120.
- [20] 解军波, 刘艳, 张彦青, 等. HPLC 法测定酸枣仁黄酮片中斯皮诺素 [J]. 中草药, 2010, 41(10): 1653-1655.
- [21] 李会军, 李萍. 高效液相色谱法蒸发光散射检测器测定酸枣仁中酸枣仁皂苷 A 及 B 的含量 [J]. 药物分析杂志, 2000, 20(2): 82-84.
- [22] 路丹, 王菲, 李清, 等. 酸枣仁皂苷提取物的制备与酸枣仁皂苷 A 和 B 的含量测定 [J]. 沈阳药科大学学报, 2011, 28(7): 535-539.