

酸枣仁中斯皮诺素及酸枣仁皂苷 A 的含量测定

UVD 串联 ELSD 法

参考——中国药典（2025 年版）一部

一、背景

酸枣仁为鼠李科植物酸枣的干燥成熟种子，味甘、酸，性平，归肝、胆、心经，其核心功效为养心补肝、宁心安神、敛汗生津，临床常用于治疗心肝血虚所致的心悸失眠、虚烦多梦、自汗盗汗及津伤口渴等症；常与茯苓、知母等配伍增强安神之效，或与人参、黄芪合用改善气虚汗出。现代研究表明，酸枣仁在调理神经衰弱、更年期综合征等方面有一定的应用价值。

斯皮诺素是从酸枣仁中提取的黄酮碳苷类化合物，在部分鼠李科植物中也有分布，其独特结构赋予良好水溶性与生物活性，具有镇静安神、抗氧化、抗炎等功效，可改善睡眠，保护心脑系统；目前广泛应用于中药制剂、功能性食品及保健品领域。酸枣仁皂苷 A 是从酸枣仁中提取的五环三萜皂苷类成分，结构复杂且具有特异性；具备显著的镇静催眠、抗焦虑作用，还能调节血脂、保护心肌。凭借这些药理活性，酸枣仁皂苷 A 成为中药安神方剂的关键物质，也在心血管疾病防治相关的医药研发与功能性产品开发中备受关注。

二、原理

酸枣仁试样经浸泡、加热回流后，采用梯度洗脱条件，使用十八烷基硅烷键合硅胶色谱柱，紫外-可见光检测器串联蒸发光散射检测器检测，分别用外标法与外标两点对数方程计算酸枣仁中斯皮诺素和酸枣仁皂苷 A 的含量。

三、实验过程

3.1 试剂与材料

- 3.1.1 水：符合 GB/T 6682 的一级水；
- 3.1.2 甲醇：色谱纯；
- 3.1.3 乙腈：色谱纯；

- 3.1.4 70 %甲醇水溶液: 移取 70 mL 甲醇 (3.1.2) 与 30 mL 水 (3.1.1), 摆匀;
- 3.1.5 90 %甲醇水溶液: 移取 90 mL 甲醇 (3.1.2) 与 10 mL 水 (3.1.1), 摆匀;
- 3.1.6 斯皮诺素标准品: CAS 号为 72063-39-9, 纯度为 99.31 %;
- 3.1.7 酸枣仁皂苷 A 标准品: CAS 号为 55466-04-1, 纯度为 99.44 %;
- 3.1.8 斯皮诺素标准储备液: 准确称取适量斯皮诺素标准品 (3.1.6), 用甲醇 (3.1.2) 溶解并配成浓度为 200.0 μ g/mL 的标准储备液, 于 4°C 下避光保存;
- 3.1.9 斯皮诺素系列标准工作液: 分别准确吸取斯皮诺素标准储备液 (3.1.8), 用甲醇 (3.1.2) 逐级稀释, 配制成斯皮诺素浓度依次为 5.0 μ g/mL、20.0 μ g/mL、50.0 μ g/mL、100.0 μ g/mL 和 200.0 μ g/mL 的系列标准工作液。临用新制;
- 3.1.10 斯皮诺素灵敏度溶液: 以浓度 5.0 μ g/mL 的斯皮诺素标准溶液作为灵敏度溶液;
- 3.1.11 酸枣仁皂苷 A 对照品溶液: 准确称取适量的酸枣仁皂苷 A 标准品 (3.1.7), 用甲醇 (3.1.2) 溶解并配成浓度为 100.0 μ g/mL 的标准储备液, 于 4 °C 下避光保存;
- 3.1.12 酸枣仁试样: 市售。

3.2 仪器与设备

- 3.2.1 高效液相色谱仪: K2025 P2 二元高压输液泵、K2025 AS 自动进样器、K2025 CO 柱温箱、K2025 UVD 紫外-可见光检测器、K2025 ELSD 蒸发光散射检测器、Wookinglab 色谱工作站;
- 3.2.2 分析天平: 精确到 0.0001 g;
- 3.2.3 粉碎机;
- 3.2.4 样品筛: 3 号;
- 3.2.5 超声波清洗机;
- 3.2.6 涡旋振荡器;
- 3.2.7 水浴锅;
- 3.2.8 冷凝管;
- 3.2.9 圆底三口烧瓶: 250 mL;
- 3.2.10 鸡心瓶: 50 mL;
- 3.2.11 旋转蒸发仪: 可在室温至 85°C 间调温, 控温精度 ± 1 °C;
- 3.2.12 容量瓶: 5 mL、100 mL, 棕色带刻度;

3.2.13 移液器: 100 μL 、1000 μL ;

3.2.14 一次性针头注射器;

3.2.15 微孔滤膜: 0.22 μm , 有机相。

3.3 测定步骤

3.3.1 供试品溶液的制备

将酸枣仁试样(3.1.12)粉碎后,过3号筛,称取约1g(精确至0.1mg)粉末,置于圆底三口烧瓶中,加入70%甲醇水溶液(3.1.4)50mL,浸泡过夜,置于水浴中加热(75°C)回流2h,放冷,滤过,滤渣用70%甲醇水溶液(3.1.4)洗涤,合并洗液与滤液,蒸干;残渣用甲醇(3.1.2)溶解,转移至5mL容量瓶中,用甲醇(3.1.2)定容至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,即得供试品溶液。

3.3.2 供试品加标溶液的制备

将酸枣仁试样(3.1.12)粉碎后,过3号筛,称取约1g(精确至0.1mg)粉末,置于圆底三口烧瓶中,加入2.5mL斯皮诺素标准储备液(3.1.8),再加入70%甲醇水溶液(3.1.4)47.5mL,浸泡过夜,置于水浴中加热(75°C)回流2h,放冷,滤过,滤渣用70%甲醇水溶液(3.1.4)洗涤,合并洗液与滤液,蒸干;残渣用甲醇(3.1.2)溶解,转移至5mL容量瓶中,用甲醇(3.1.2)定容至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,即得供试品加标溶液。

3.3.3 色谱条件

a) 色谱柱: C₁₈, 4.6×250 mm, 5 μm 或者相当的色谱柱;

b) 流动相: 以乙腈(3.1.3)为流动相A, 水(3.1.1)为流动相B, 按下表进行梯度洗脱:

时间 (min)	流速 (mL/min)	流动相A (%)	流动相B (%)
0.0	1.0	10.0	90.0
10.0	1.0	19.0	81.0
20.0	1.0	23.0	77.0
30.0	1.0	40.0	60.0
37.0	1.0	40.0	60.0
43.0	1.0	100.0	0.0

注: 为了系统在进样前达到平衡, 每次进样前运行10min。

- c) 进样量: 酸枣仁皂苷 A 对照品溶液 5 μ L、15 μ L, 供试品溶液及斯皮诺素系列标准工作液 10 μ L;
- d) 洗针液: 90 % 甲醇水溶液;
- e) 柱温: 25°C;
- f) 检测器及参数: 紫外-可见光检测器, 检测波长为 335 nm; 蒸发光散射检测器, 蒸发温度为 80°C, 气体流量为 3.0 L/min。

四、结果

4.1 斯皮诺素测定结果

4.1.1 重复性测试

按照色谱条件 (3.3.3) 进行采集, 将斯皮诺素标准溶液 (浓度为 50 μ g/mL) 进样 10 μ L, 色谱图如图 1 所示, 积分结果如表 1 所示。

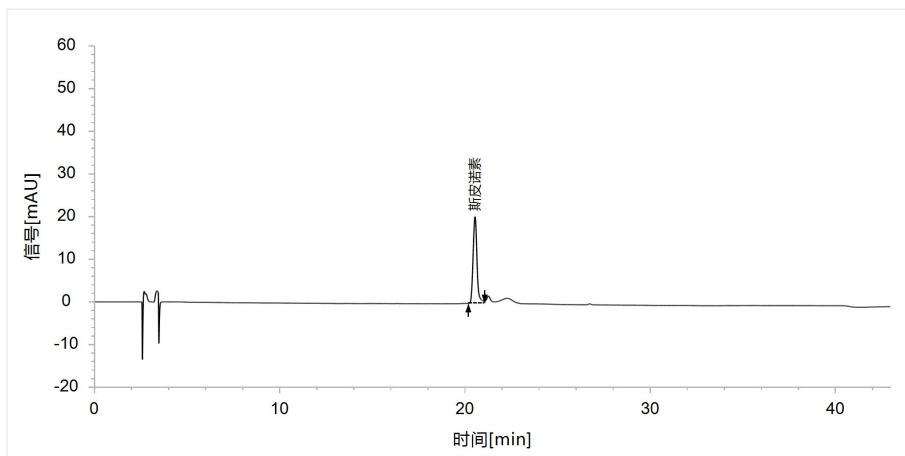


图 1 斯皮诺素标准溶液的色谱图

表 1 斯皮诺素标准溶液色谱图积分结果

目标物	保留时间 (min)	峰面积 (mAU.s)	峰高 (mAU)	理论塔板数	对称/拖尾因子
斯皮诺素	20.542	300.770	20.383	48818	1.21

由表 1 中数据可知, 斯皮诺素峰的理论塔板数为 48818, 拖尾因子为 1.21, 具有良好的峰形。

将斯皮诺素标准溶液 (浓度为 50 μ g/mL) 连续进样 7 针, 叠加的色谱图如图 2 所示,

结果见表 2。

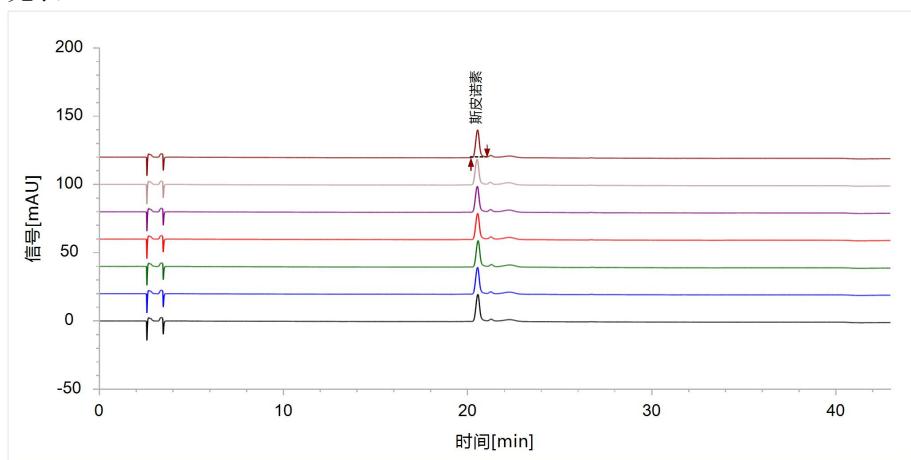


图 2 斯皮诺素标准溶液连续进样 7 针叠加的色谱图

表 2 斯皮诺素标准溶液连续进样 7 针重复性数据统计

目标物	项目	1	2	3	4	5	6	7	平均值	RSD%
斯皮诺素	保留时间 (min)	20.542	20.558	20.542	20.575	20.542	20.525	20.517	20.543	0.09
	峰面积 (mAU·s)	294.896	292.525	293.943	292.193	292.328	292.234	291.581	292.814	0.40

由表 2 中数据可知, 斯皮诺素标准溶液连续进样 7 针, 保留时间的 RSD 为 0.09 %, 峰面积的 RSD 为 0.40 %, 具有良好的定性定量重复性。

4.1.2 仪器灵敏度测试

按照色谱条件 (3.3.3) 进行采集, 斯皮诺素灵敏度溶液 (3.1.10) 的色谱图如图 3 所示, 计算结果见表 3。

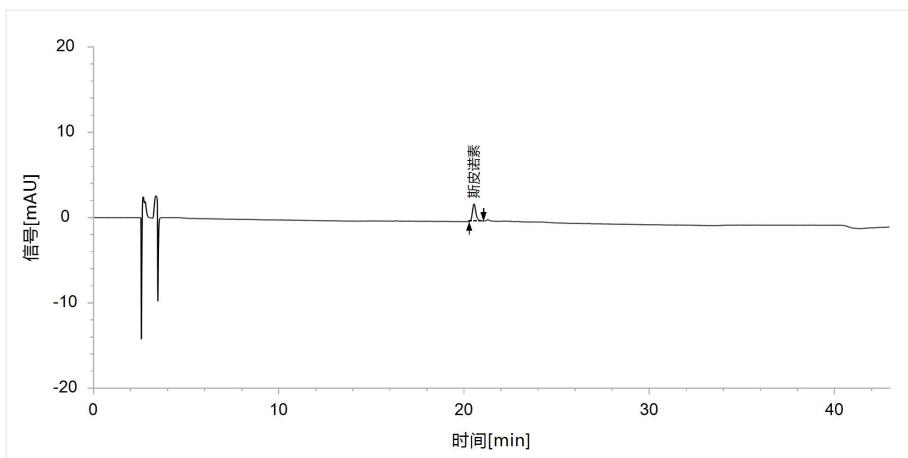


图 3 斯皮诺素灵敏度的色谱图

表 3 仪器灵敏度测试数据

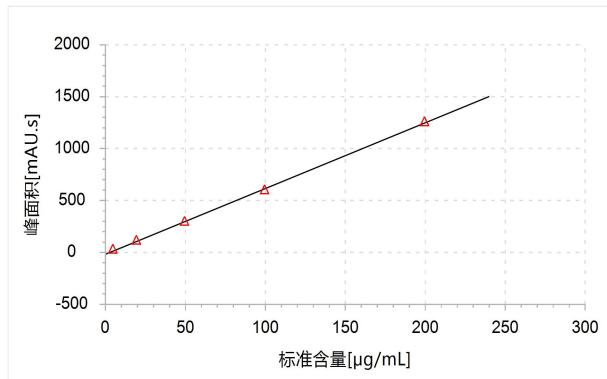
目标物	浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	峰高 (mAU)	噪声 (mAU)	S/N	LOD ($\mu\text{g/mL}$)	LOQ ($\mu\text{g/mL}$)
斯皮诺素	5.0	2.064	0.026	129.0	0.116	0.388

由表 3 中数据可知, 斯皮诺素的仪器检出限为 $0.116 \mu\text{g/mL}$, 仪器定量限为 $0.388 \mu\text{g/mL}$ 。

4.1.3 含量测定

(1) 校准曲线绘制

按照色谱条件 (3.3.3), 将斯皮诺素系列标准工作液 (3.1.9) 上机测定, 以浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标, 绘制校准曲线, 线性方程和确定系数如图 4 所示。



方程式 $y=6.33315*x-17.48598$
 相关系数 (R) 0.9996
 确定系数 (R^2) 0.9992

图 4 斯皮诺素的校准曲线

由图 4 可知, 斯皮诺素在 $5.0 \mu\text{g/mL} \sim 200.0 \mu\text{g/mL}$ 浓度范围内呈现良好的线性关系, 确定系数 $R^2 > 0.999$ 。

斯皮诺素系列标准工作液叠加的色谱图如图 5 所示。

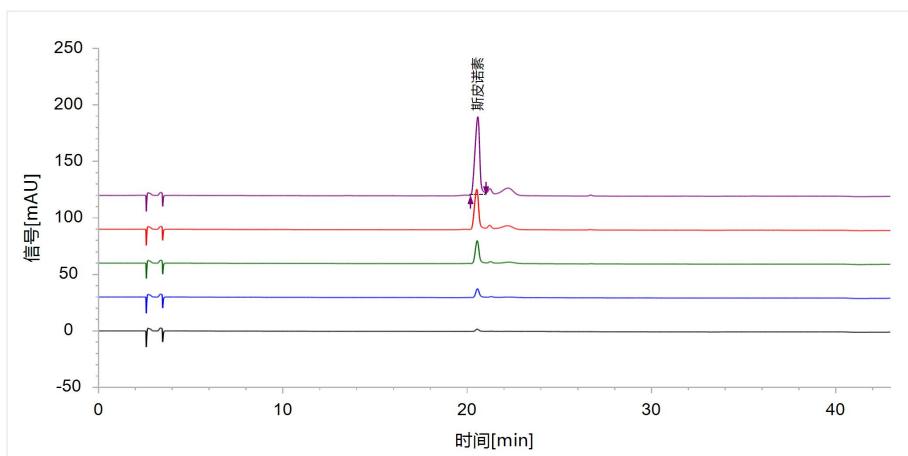


图 5 斯皮诺素系列标准工作液叠加的色谱图

(2) 含量测定

按照色谱条件（3.3.3）进行采集，依据公式（1）计算试样中斯皮诺素的含量。

$$\omega = \frac{C \times V}{m \times 10^6} \times 100 \quad \text{----公式 (1)}$$

式中： ω ----为试样中斯皮诺素的含量，以其质量分数计（%）；

C ----为从校准曲线得到的供试品溶液中斯皮诺素的浓度，单位为微克每毫升（ μ g/mL）；

V ----为试样提取液的体积，单位为毫升（mL）；

m ----为试样质量，单位为克（g）；

10^6 ，100----为单位换算系数。

空白溶液、供试品溶液和供试品加标溶液的色谱图如图 6~图 8 所示。

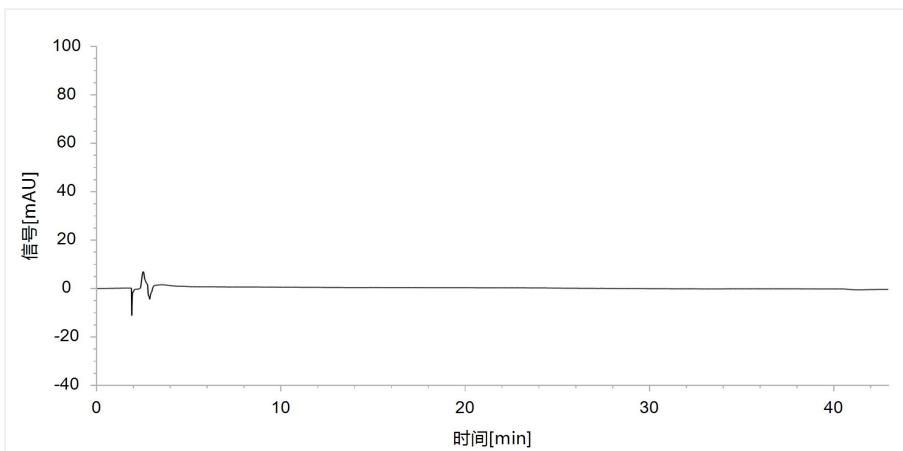


图 6 空白溶液的色谱图（UVD）

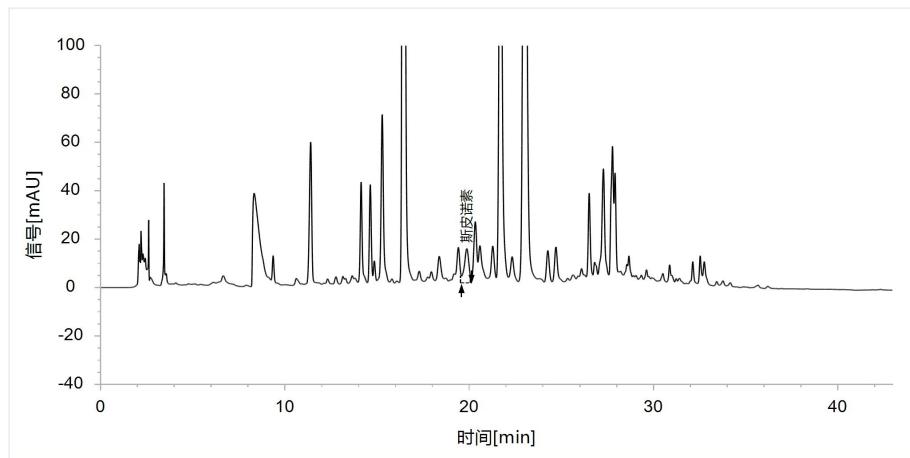


图 7 供试品溶液的色谱图 (UVD)

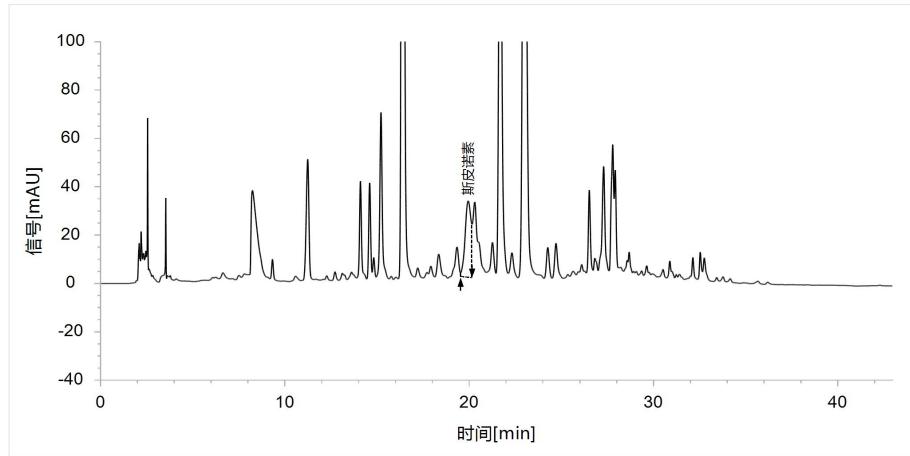


图 8 供试品加标溶液的色谱图 (UVD)

依据公式 (1) 进行计算, 酸枣仁试样中斯皮诺素的含量为 0.02 %, 不满足《中国药典 (2025 年版)》一部中按干燥品计算, 含斯皮诺素不得少于 0.07 % 的要求; 加标回收实验中, 斯皮诺素的加标回收率为 80.9 %。

4.2 酸枣仁皂苷 A 测定结果

4.2.1 酸枣仁皂苷 A 对照品溶液色谱图

按照色谱条件 (3.3.3) 进行采集, 将酸枣仁皂苷 A 对照品溶液 (3.1.11) 进样 15 μ L, 色谱图如图 9 所示, 积分结果如表 4 所示。

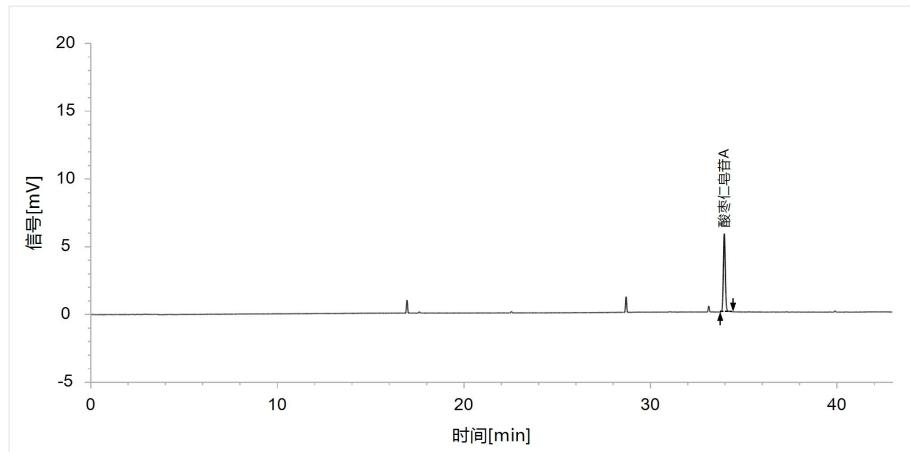


图 9 酸枣仁皂苷 A 对照品溶液的色谱图

表 4 酸枣仁皂苷 A 对照品溶液色谱图积分结果

目标物	保留时间 (min)	峰面积 (mV.s)	峰高 (mV)	理论塔板数	对称/拖尾因子
酸枣仁皂苷 A	33.956	42.225	5.776	503314	1.08

由表 4 中数据可知, 酸枣仁皂苷 A 峰的理论塔板数为 503314, 拖尾因子为 1.08, 具有良好的峰形。

4.2.2 含量测定

(1) 外标两点对数方程

精密吸取酸枣仁皂苷 A 对照品溶液 (3.1.11) 5 μ L、15 μ L 与供试品溶液 (3.3.1) 10 μ L, 依次注入液相色谱仪中测定。以 \log (进样量) 为横坐标, 以 \log (峰面积) 为纵坐标, 绘制外标两点对数方程, 如图 10 所示, 不同进样量酸枣仁皂苷 A 对照品溶液的色谱图如图 11 所示。

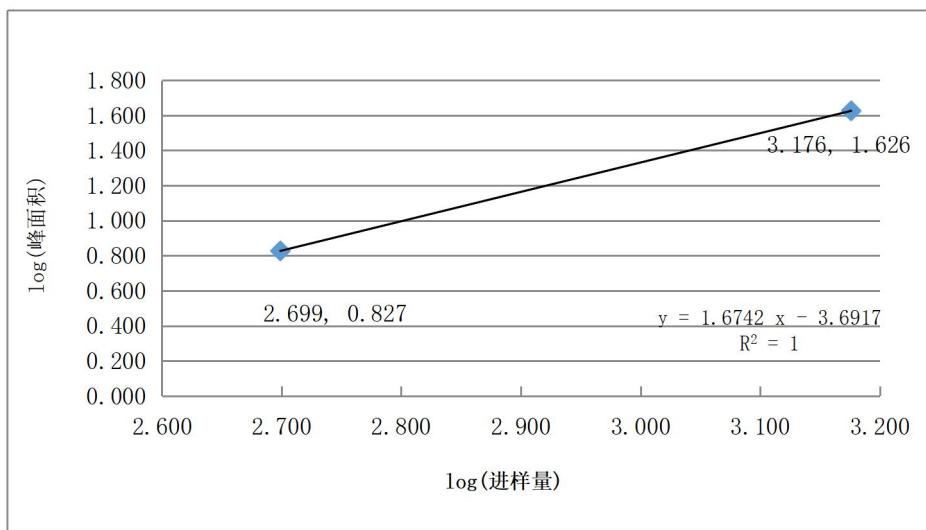


图 10 酸枣仁皂苷 A 外标两点对数方程

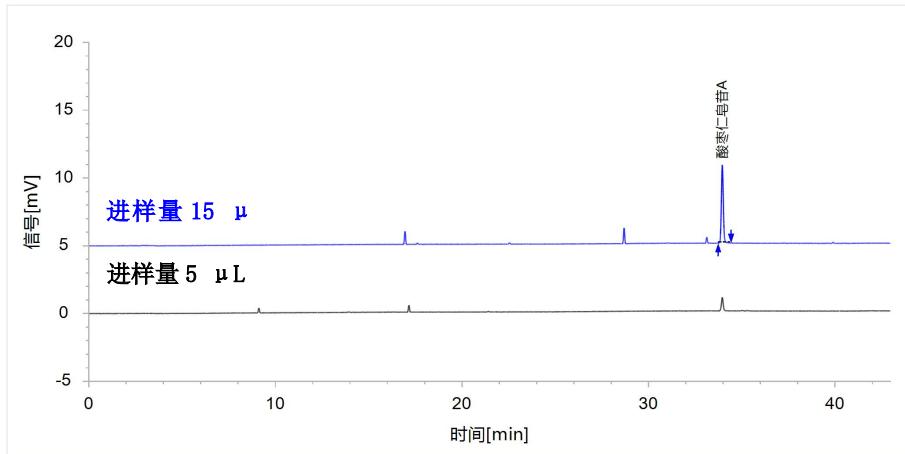


图 11 不同进样量酸枣仁皂苷 A 对照品溶液的色谱图

(2) 含量测定

以市售酸枣仁（3.1.12）作为试样，按照流程（3.3.1）进行处理。通过供试品溶液的色谱图获得酸枣仁皂苷 A 峰面积，计算 \log （峰面积）后带入外标两点对数方程，得到 \log （进样量），再通过 \log 反函数计算进样量。依据公式（2）和公式（3）计算试样中酸枣仁皂苷 A 的含量。

$$C_0 = \frac{m_0 \times 1000}{V_0 \times 1000} \quad \text{-----公式 (2)}$$

式中： C_0 ——为供试品溶液中酸枣仁皂苷 A 的质量浓度，单位为毫克每毫升 (mg/mL)；

m_0 ——为通过外标两点对数方程计算得到的酸枣仁皂苷 A 的进样量，单位为微克 (μg)；

V_0 ——为供试品溶液的进样体积，单位为微升 (μL)；

1000——为单位换算系数。

$$\omega = \frac{C_0 \times V}{m} \quad \text{-----公式 (3)}$$

式中： ω ——为试样中酸枣仁皂苷 A 的含量，单位为毫克每克 (mg/g)；

C_0 ——为供试品溶液中酸枣仁皂苷 A 的质量浓度，单位为毫克每毫升 (mg/mL)；

V ——为试样的定容体积，单位为毫升 (mL)；

m ——为试样的质量，单位为克 (g)。

空白溶液和供试品溶液的色谱图如图 12~图 13 所示。

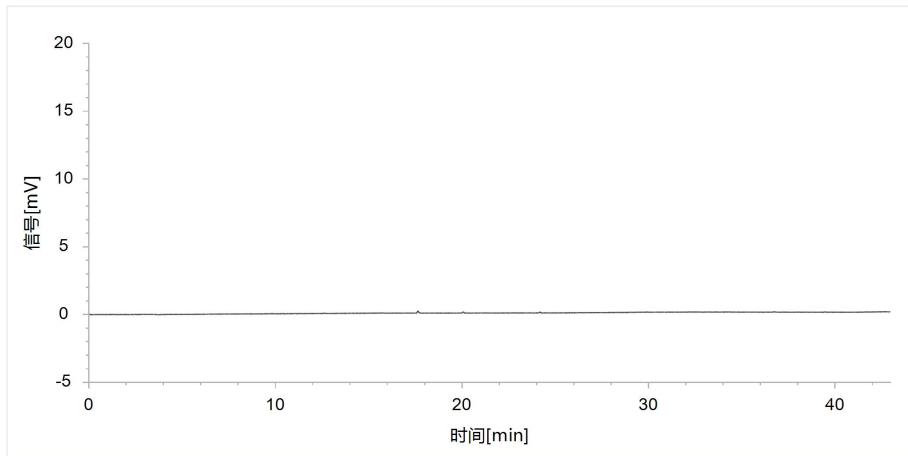


图 12 空白溶液的色谱图 (ELSD)

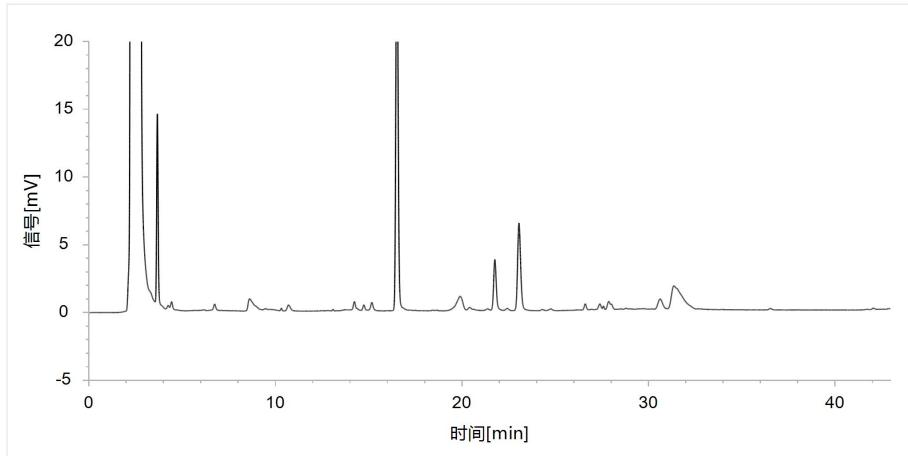


图 13 供试品溶液的色谱图 (ELSD)

由图 13 可知, 酸枣仁试样中未检测出酸枣仁皂苷 A, 不满足《中国药典 (2025 年版)》一部中按干燥品计算, 含酸枣仁皂苷 A 不得少于 0.03 % 的要求。

五、结论

本实验以乙腈和水为流动相, 使用梯度洗脱条件, 将紫外-可见光检测器串联蒸发光散射检测器, 对斯皮诺素和酸枣仁皂苷 A 的理论塔板数、重复性以及酸枣仁中斯皮诺素和酸枣仁皂苷 A 的含量进行测定, 实验结果表明: 斯皮诺素测定项目中, 斯皮诺素峰的理论塔板数为 48818, 拖尾因子为 1.21, 具有良好的峰形; 斯皮诺素标准溶液连续进样 7 针, 保留时间的 RSD 为 0.09 %, 峰面积的 RSD 为 0.40 %, 具有良好的定性定量重复性; 灵敏度测试中,

斯皮诺素的仪器检出限为 $0.116 \mu\text{g/mL}$ ，仪器定量限为 $0.388 \mu\text{g/mL}$ ；斯皮诺素在 $5.0 \mu\text{g/mL} \sim 200.0 \mu\text{g/mL}$ 浓度范围内呈现良好的线性关系，确定系数 $R^2 > 0.999$ ；酸枣仁试样中斯皮诺素的含量为 0.02 %，不满足《中国药典（2025 年版）》一部中按干燥品计算，含斯皮诺素不得少于 0.07 % 的要求；加标回收实验中，斯皮诺素的加标回收率为 80.9 %。酸枣仁皂苷 A 测定项目中，酸枣仁皂苷 A 峰的理论塔板数为 503314，拖尾因子为 1.08，具有良好的峰形；酸枣仁试样中未检测出酸枣仁皂苷 A，不满足《中国药典（2025 年版）》一部中按干燥品计算，含酸枣仁皂苷 A 不得少于 0.03 % 的要求。因此，悟空 K2025 高效液相色谱仪配置紫外-可见光检测器串联蒸发光散射检测器，可同时对酸枣仁中斯皮诺素和酸枣仁皂苷 A 的含量进行测定。

附 1: 仪器配置清单

品名	配置/描述	数量	单位
A Pump Unit 泵单元			
二元高压输液系统	二元高压输液泵 (62 Mpa, 内置溶剂托盘)	1	Set
	混合器	1	Set
	流动相瓶 (肖特瓶, 1 L)	4	Pc
	四通道溶剂切换阀	1	Set
	自动在线清洗系统	1	Set
	在线脱气机	1	Set
B Injector 进样器			
自动进样系统	自动进样器 (108位2 mL 样品瓶)	1	Set
	不锈钢定量环, 100 μ L	1	Set
	54孔板组件	2	Set
	样品瓶 (2mL, 100pc/set, 含瓶盖)	1	Set
	洗针液在线脱气组件	1	Set
C Column Oven 柱温箱			
制冷版柱温箱	室温以下10°C至90°C	1	Set
D Detector 检测器			
紫外-可见光检测器	波长范围: 190-900 nm	1	Set
蒸发光散射检测器	典型定量范围: 0.1 μ g-30 μ g	1	Set
E Workstation 工作站			
Workstation 工作站	Wookinglab 色谱数据软件V1.0	1	Pc
I Columns 色谱柱			
色谱柱	C ₁₈ , 5 μ m, 4.6 x 250m m (Krom asil)	1	Pc

悟空 K2025 高效液相色谱仪



可靠	精准	友好	合规
<ul style="list-style-type: none">强化可靠性设计理念采用全产业链生产模式历经权威机构可靠性验证	<ul style="list-style-type: none">独特的送液及进样技术高灵敏度检测器强大的数据处理软件	<ul style="list-style-type: none">工作站简洁易用,一小时内快速上手工作站内置标准方法库硬件多项人性化细节设计	<ul style="list-style-type: none">数据库存储模式多级权限管理&审计追踪&电子签名满足 GMP/GLP/FDA 21 CFR PART 11 要求



悟空科学仪器（上海）有限公司

应用实验室

网址: www.wooking.com

联系热线: 4006186188