

[质 量]

HPLC法同时测定三参降脂液中9种成分

李海燕

(东营市食品药品检验中心, 山东 东营 257091)

摘要: 目的 建立HPLC法同时测定三参降脂液(泽泻、黄芪、丹参等)中24-乙酰泽泻醇A、23-乙酰泽泻醇B、毛蕊异黄酮-7-O- β -D-吡喃葡萄糖苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮、芒柄花素、丹参素、丹酚酸B、丹参酮ⅡA的含有量。

方法 该药物甲醇提取液的分析采用Diamonsil C₁₈色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相乙腈-0.1%甲酸,梯度洗脱;检测波长208、254、280 nm;体积流量0.9 mL/min;柱温30℃。结果 9种成分在各自范围内线性关系良好($r>0.999\ 0$),平均加样回收率96.90%~100.08%,RSD 0.67%~1.45%。结论 该方法简便准确,专属性强,重复性好,可用于三参降脂液的质量控制。

关键词: 三参降脂液; 化学成分; HPLC

中图分类号: R927.2

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2018)12-2677-04

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2018.12.013

Simultaneous determination of nine constituents in Sanshen Jiangzhi Liquid by HPLC

LI Hai-yan

(Dongying Municipal Food and Drug Inspection Center, Dongying 257091, China)

ABSTRACT: AIM To establish an HPLC method for the simultaneous content determination of alisol A 24-acetate, alisol B 23-acetate, calycosin-7-O- β -D-glucopyranoside, ononin, calycosin, formononetin, danshensu, salvianolic acid B and tanshinone ⅡA in Sanshen Jiangzhi Liquid (*Alismatis Rhizoma*, *Astragali Radix*, *Salviae miltiorrhizae Radix et Rhizoma*, etc.). **METHODS** The analysis of methanol extract of this drug was performed on a 30℃ thermostatic Diamonsil C₁₈ column (250 mm×4.6 mm, 5 μm), with the mobile phase comprising of acetonitrile-0.1% formic acid flowing at 0.9 mL/min in a gradient elution manner, and the detection wavelengths were set at 208, 254, 280 nm. **RESULTS** Nine constituents showed good linear relationships within their own ranges ($r > 0.999\ 0$), whose average recoveries were 96.90%~100.08% with the RSDs of 0.67%~1.45%. **CONCLUSION** This simple, accurate, specific and reproducible method can be used for the quality control of Sanshen Jiangzhi Liquid.

KEY WORDS: Sanshen Jiangzhi Liquid; chemical constituents; HPLC

三参降脂液收载于《卫生部颁药品标准》中,药成方制剂第八册,由泽泻、黄芪、丹参、刺五加、何首乌、生晒参、石菖蒲、三七8味药材加工而成,具有补气活血、化痰降脂的功效,临幊上主要用于冠心病引起的胸闷、胸痹、心痛气短、高血脂等症状的治疗^[1]。方中丹参、黄芪、泽泻为其主要药效成分,其中丹参具有活血祛瘀、凉血止

痛、清心除烦等功效,丹参素、丹酚酸B、迷迭香酸等为其水溶性酚酸类主要活性成分,丹参酮ⅡA、丹参酮Ⅰ等为其脂溶性二萜醌类主要活性成分,现代药理研究表明,丹参中酚酸类、二萜醌类成分生物活性显著,具有扩张冠状动脉、防止心肌缺血和心肌梗死、降低心肌耗氧量等作用,广泛应用于冠心病等多种心血管疾病的治疗^[2-3];黄芪具有补气

收稿日期: 2018-04-01

作者简介: 李海燕(1978—),女,主管药师,从事药品检验、药械不良反应监测等工作。Tel: 18678620068, E-mail: dongying0068@163.com

升阳、生津养血、行滞通痹等功效，对心血管、脑血管、糖尿病等相关心血管疾病具有明显改善作用^[4-6]，可通过预防动脉粥样硬化来降低发生冠心病等心脑血管并发症的发生率^[7]，主要含有含黄酮、多糖、皂苷、氨基酸、多种微量元素等化学成分，以毛蕊异黄酮-7-O-β-D-吡喃葡萄糖苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮、芒柄花素等黄酮为主^[8]；泽泻具有利水渗湿、化浊降脂的功效，其中24-乙酰泽泻醇A、23-乙酰泽泻醇B等泽泻醇类为其主要药理活性成分^[9]，具有降血压、降脂、抑制血小板聚集、抗动脉粥样硬化、防治心血管系统疾病等作用^[10-11]。

目前，三参降脂液现行质量标准中仅规定其性状、理化鉴别和乙醇量，未建立定量测定方法，缺少相关文献报道。为更全面地控制三参降脂液质量，本实验HPLC法同时测定该制剂中泽泻指标性成分24-乙酰泽泻醇A、23-乙酰泽泻醇B，黄芪指标性成分毛蕊异黄酮-7-O-β-D-吡喃葡萄糖苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮、芒柄花素，以及丹参指标性成分丹参素、丹酚酸B、丹参酮Ⅱ_A的含有量，以期为其质量标准提高提供数据支持。

1 材料

Waters e2695型高效液相色谱仪，配置Waters 2487可变波长检测器。三参降脂液（河南太龙药业股份有限公司，每支装10 mL，批号170213042、170510052、171024052）。24-乙酰泽泻醇A对照品（18674-16-3，含有量98.0%，宝鸡市辰光生物科技有限公司）；23-乙酰泽泻醇B（111846-201705，含有量99.7%）、毛蕊异黄酮-7-O-β-D-吡喃葡萄糖苷（111920-201606，含有量97.6%）、丹酚酸B（111562-201716，含有量94.1%）、丹参酮Ⅱ_A（110766-201721，含有量99.5%）对照品（中国食品药品检定研究院）；芒柄花苷（486-62-4，含有量98.0%）、毛蕊异黄酮（20575-57-9，含有量98.0%）；芒柄花素（485-72-3，含有量98.0%）、丹参素（22681-72-7，含有量98.0%）对照品（上海纯优生物科技有限公司）。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Diamonsil C₁₈色谱柱（250 mm×4.6 mm, 5 μm）；流动相乙腈（A）-0.1%甲酸（B），梯度洗脱（程序见表1）；体积流量0.9 mL/min；柱温30℃；检测波长208 nm（0~21 min, 24-乙酰泽泻醇A、23-乙酰泽泻醇B）^[12-13]、254 nm（21~34 min, 毛蕊异黄酮-7-O-β-D-

吡喃葡萄糖苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮、芒柄花素）^[8]、280 nm（34~55 min, 丹参素、丹酚酸B、丹参酮Ⅱ_A）^[2,14-15]；进样量10 μL。

表1 梯度洗脱程序

Tab. 1 Gradient elution programs

时间/min	A 乙腈/%	B 0.1% 甲酸/%
0~14	36.0	64.0
14~21	36.0→48.0	64.0→52.0
21~34	48.0→61.0	52.0→39.0
34~47	61.0→82.0	39.0→18.0
47~55	82.0→36.0	18.0→64.0

2.2 溶液制备

2.2.1 供试品溶液 精密量取三参降脂液10 mL，置于25 mL量瓶中，甲醇稀释至刻度，摇匀，过滤，即得。

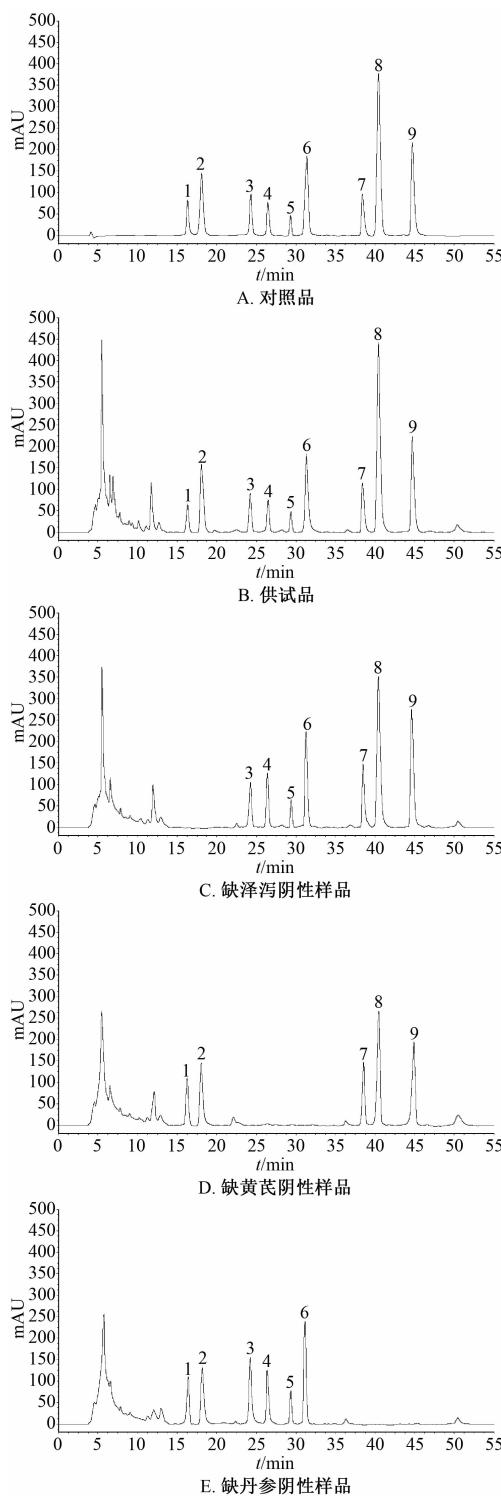
2.2.2 对照品溶液 精密称取各对照品适量，置于9个20 mL量瓶中，甲醇制分别含24-乙酰泽泻醇A、23-乙酰泽泻醇B、毛蕊异黄酮-7-O-β-D-吡喃葡萄糖苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮、芒柄花素、丹参素、丹酚酸B、丹参酮Ⅱ_A0.192、0.376、0.232、0.218、0.174、0.552、0.288、5.792、1.136 mg/mL的贮备液。分别精密量取2.5 mL，置于同一50 mL量瓶中，甲醇定容，即得。

2.2.3 阴性样品溶液 按照三参降脂液质量标准项下的处方和制法，分别制备缺泽泻、黄芪、丹参的阴性样品，按“2.2.1”项下方法制备，即得。

2.3 系统适用性考察 精密量取供试品、对照品、阴性样品溶液，在“2.1”项色谱条件下进样测定，结果见图1。由图可知，各成分均能达到有效分离，分离度均大于1.5，理论塔板数按各色谱峰计均大于4 000，阴性无干扰。

2.4 线性关系考察 精密量取贮备液0.1、0.2、0.5、1.0、1.5、2.0 mL，甲醇分别定容至20 mL，制得20倍线性关系的6个对照品溶液，在“2.1”项色谱条件下进样测定。以质量浓度为横坐标（X），峰面积为纵坐标（Y）进行回归，结果见表2，可知各成分在各自范围内线性关系良好。

2.5 精密度试验 取“2.2.2”项下对照品溶液，在“2.1”项色谱条件下进样测定6次，测得24-乙酰泽泻醇A、23-乙酰泽泻醇B、毛蕊异黄酮-7-O-β-D-吡喃葡萄糖苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮、芒柄花素、丹参素、丹酚酸B、丹参酮Ⅱ_A峰面积RSD分别为1.19%、1.03%、0.97%、1.54%、1.16%、0.83%、1.08%、0.52%、0.75%，表明



1. 24-乙酰泽泻醇 A 2. 23-乙酰泽泻醇 B 3. 毛蕊异黄酮-7-O- β -D-吡喃葡萄糖苷 4. 芒柄花苷 5. 毛蕊异黄酮 6. 芒柄花素 7. 丹参素 8. 丹酚酸 B 9. 丹参酮 II_A

1. alisol A 24-acetate 2. alisol B 23-acetate 3. calycosin-7-O- β -D-glucopyranoside 4. ononin 5. calycosin 6. formononetin
7. danshensu 8. salvianolic acid B 9. tanshinone II_A

图1 各成分HPLC色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of various constituents

仪器精密度良好。

2.6 稳定性试验 取同一供试品溶液, 室温下于0、2、4、6、8、12 h在“2.1”项色谱条件下进样测定, 测得24-乙酰泽泻醇A、23-乙酰泽泻醇B、毛蕊异黄酮-7-O- β -D-吡喃葡萄糖苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮、芒柄花素、丹参素、丹酚酸B、丹参酮II_A峰面积RSD分别为1.16%、1.04%、0.86%、1.07%、1.21%、0.98%、1.05%、0.56%、0.77%, 表明溶液在12 h内稳定性良好。

2.7 重复性试验 取三参降脂液适量, 按“2.2.1”项下方法制备6份供试品溶液, 在“2.1”项色谱条件下进样测定, 测得24-乙酰泽泻醇A、23-乙酰泽泻醇B、毛蕊异黄酮-7-O- β -D-吡喃葡萄糖苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮、芒柄花素、丹参素、丹酚酸B、丹参酮II_A含有量RSD分别为1.62%、1.37%、1.11%、1.24%、1.86%、1.21%、1.51%、0.76%、0.98%, 表明该方法重复性良好。

2.8 加样回收率试验 取含有量已知的三参降脂液适量, 精密量取9份, 每份5.0 mL, 置于25 mL量瓶中, 精密加入适量对照品溶液(24-乙酰泽泻醇A、23-乙酰泽泻醇B、毛蕊异黄酮-7-O- β -D-吡喃葡萄糖苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮、芒柄花素、丹参素、丹酚酸B、丹参酮II_A质量浓度分别为0.519、1.352、0.797、0.649、0.476、1.853、0.924、1.921、0.716 mg/mL), 使高、中、低质量浓度对照品加入量与供试品中待测定成分量之比分别控制在0.5:1、1:1、1.5:1左右, 再按“2.2.1”项下方法制成高、中、低3个质量浓度(每个质量浓度3份)的加样回收样品溶液, 在“2.1”项色谱条件下进样测定, 计算回收率。结果, 24-乙酰泽泻醇A、23-乙酰泽泻醇B、毛蕊异黄酮-7-O- β -D-吡喃葡萄糖苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮、芒柄花素、丹参素、丹酚酸B、丹参酮II_A平均加样回收率分别为97.71%、99.32%、98.87%、97.89%、96.90%、99.23%、98.43%、100.08%、98.84%, RSD分别为1.24%、0.67%、1.40%、1.29%、1.38%、0.98%、1.33%、0.79%、1.45%。

2.9 样品含有量测定 取3批三参降脂液, 按“2.2.1”项下方法制备供试品溶液, 在“2.1”项色谱条件下进样测定, 外标法计算含有量, 结果见表3。

表2 各成分线性关系

Tab. 2 Linear relationships of various constituents

成分	回归方程	r	线性范围/(μg·mL⁻¹)
24-乙酰泽泻醇 A	$Y = 9.1257 \times 10^5 X + 435.7$	0.999 4	0.96 ~ 19.20
23-乙酰泽泻醇 B	$Y = 1.4832 \times 10^6 X + 266.2$	0.999 9	1.88 ~ 37.60
毛蕊异黄酮-7-O-β-D-吡喃葡萄糖苷	$Y = 1.0319 \times 10^6 X - 293.4$	0.999 6	1.16 ~ 23.20
芒柄花苷	$Y = 8.7905 \times 10^6 X - 168.5$	0.999 3	1.09 ~ 21.80
毛蕊异黄酮	$Y = 7.3181 \times 10^5 X + 189.0$	0.999 8	0.87 ~ 17.40
芒柄花素	$Y = 1.3987 \times 10^6 X - 277.3$	0.999 5	2.76 ~ 55.20
丹参素	$Y = 1.2546 \times 10^6 X - 412.7$	0.999 7	1.44 ~ 28.80
丹酚酸 B	$Y = 6.5934 \times 10^5 X + 330.5$	0.999 2	28.96 ~ 579.20
丹参酮 II _A	$Y = 8.9372 \times 10^5 X - 246.6$	0.999 6	5.68 ~ 113.60

表3 各成分含有量测定结果 (mg/mL, n=3)

Tab. 3 Results of content determination of various constituents (mg/mL, n=3)

批号	24-乙酰泽 泻醇 A	23-乙酰泽 泻醇 B	毛蕊异黄酮-7-O-β-D- 吡喃葡萄糖苷	芒柄花苷	毛蕊异黄酮	芒柄花素	丹参素	丹酚酸 B	丹参酮 II _A
170213042	0.021	0.054	0.032	0.026	0.019	0.074	0.037	0.769	0.143
170510052	0.022	0.051	0.033	0.023	0.018	0.069	0.039	0.753	0.151
171024052	0.019	0.057	0.031	0.025	0.021	0.075	0.035	0.781	0.139

3 讨论与结论

本实验考察了乙腈-水^[9,13,16-18]、甲醇-水、乙腈-0.1% 磷酸^[13]、乙腈-0.1% 甲酸流动相体系^[2,8]，以三参降脂液中24-乙酰泽泻醇A、23-乙酰泽泻醇B、毛蕊异黄酮-7-O-β-D-吡喃葡萄糖苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮、芒柄花素、丹参素、丹酚酸B、丹参酮II_A峰形、分离效果、色谱峰基线平稳情况为考察指标，同时对流动相比例进行摸索，最终确定以乙腈-0.1% 甲酸为流动相，在“2.1”项色谱条件下梯度洗脱，此时各成分色谱峰峰形对称，与相邻色谱峰均能达到有效分离。

综上所述，本实验建立HPLC法同时测定三参降脂液中9种成分的含有量，该方法简便准确，专属性强，重复性好，可用于该制剂的质量控制。

参考文献:

- [1] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 中华人民共和国卫生部药品标准(中药成方制剂第八册) [S]. 1993: 13.
- [2] 翟学佳, 徐锦凤. 高效液相色谱法同时测定丹参药材水溶性和脂溶性成分的含量[J]. 医药导报, 2009, 28(10): 1345-1348.
- [3] 陈磊, 陆茵, 郑仕中. 丹参药理活性成分的整合效应[J]. 中草药, 2009, 40(3): 476-479.
- [4] 李晶晶, 崔国祯, 王亮, 等. 毛蕊异黄酮对H9c2细胞缺糖缺氧损伤的保护作用[J]. 中药药理与临床, 2014, 30(5): 32-35.
- [5] 顾晴. 治疗冠心病中药的研究进展[J]. 实用心脑肺血管病杂志, 2011, 19(2): 240-242.
- [6] 李伟霞, 刘现磊, 唐进法, 等. 黄芪-丹参药对活性成分网络药理学研究[J]. 中医学报, 2017, 32(11): 2171-2175, 2180.
- [7] 张国用. 中药黄芪的药理作用及其临床应用研究[J]. 实用心脑肺血管病杂志, 2012, 20(6): 1059-1060.
- [8] 付娟, 杨世海, 黄林芳. 超高效液相色谱法同时测定黄芪中6种黄酮类成分的含量[J]. 中国药学杂志, 2013, 48(11): 916-919.
- [9] 陈建忠, 潘馨, 黄若旺. HPLC法同时测定泽泻中2种有效成分的含量[J]. 药物分析杂志, 2007, 27(5): 721-723.
- [10] 陈兴娟, 尹萌萌, 魏建梁, 等. 泽泻在心血管疾病治疗中的应用[J]. 长春中医药大学学报, 2014, 30(4): 620-622.
- [11] 何熹延. 泽泻与高脂血症、动脉粥样硬化和脂肪肝[J]. 中西医结合杂志, 1981, 1(2): 114-117, 128.
- [12] 吴秋云, 陈艳红, 谢友良. 不同产地泽泻有效成分的含量测定[J]. 临床医学工程, 2010, 17(10): 60-61.
- [13] 文红梅, 彭国平, 池玉梅, 等. 泽泻药材的质量标准研究 I——泽泻中2种泽泻醇的HPLC测定法[J]. 药物分析杂志, 1998, 18(6): 375-377.
- [14] 程沛, 韩东岐, 胡伟慧, 等. 高效液相色谱法同时测定丹参中10种水溶性和4种脂溶性成分的含量[J]. 药物分析杂志, 2015, 35(6): 991-996.
- [15] 周国军, 李焱, 秦民坚, 等. 高效液相色谱法快速测定丹参中5种活性成分的含量[J]. 药物分析杂志, 2012, 32(8): 1357-1361.
- [16] 丘建芳, 林婧, 许文, 等. HPLC-DAD-ELSD测定泽泻药材中4种三萜类成分含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(2): 42-46.
- [17] 王晓辉, 刘涛, 李清, 等. 高效液相色谱法同时测定黄芪中的五种异黄酮类成分[J]. 色谱, 2006, 24(5): 486-488.
- [18] 蒲清荣, 黄锐, 赵剑, 等. HPLC法测定不同主产地黄芪饮片的4种黄酮的含量[J]. 云南中医中药杂志, 2016, 37(3): 63-65.