

RP-HPLC 法测定保肝丸中五味子甲、乙、丙素及熊果酸

刘宏胜¹, 张雅敏^{2*}, 王树森¹, 沈中阳¹, 刘洪利³

1. 天津市第一中心医院 卫生部危重病急救医学重点实验室, 天津 300192

2. 天津市第一中心医院 肝胆外科, 天津 300192

3. 天津市药科中等专业学校, 天津 300462

摘要: 目的 建立 RP-HPLC 法测定保肝丸中五味子甲、乙、丙素及熊果酸的量, 对保肝丸的制剂质量提供保障。方法 采用 ZORBAX SB-C₁₈ (150 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱; 流动相为乙腈-0.1%磷酸水溶液 (67:33), 体积流量 1.0 mL/min; 紫外检测波长为 210 nm; 柱温 30 ℃; 进样量 10 μL。结果 五味子甲、乙、丙素及熊果酸的最低检测质量浓度分别为 0.016、0.019、0.020、0.025 mg/L, 线性范围分别为 3.906~250.000、5.323~340.000、3.225~205.000、5.323~340.000 mg/L。供试样品中五味子甲素、五味子乙素、五味子丙素及熊果酸的平均回收率分别为 100.79%、101.09%、101.26%、101.16%; 精密度 RSD 分别为 1.76%、1.69%、1.80%、1.86%; 重复性试验 RSD 分别为 1.77%、1.66%、1.49%、1.56%; 稳定性试验分别为 1.61%、1.39%、1.60%、1.56%。保肝丸 (0.560 mg) 含五味子甲、乙、丙素及熊果酸平均量分别为 0.444、1.066、0.3125、1.068 μg/丸。结论 该方法简便、灵敏度高、重复性好、回收率高, 是检测五味子甲、乙、丙素及熊果酸质量浓度的可信方法。

关键词: 保肝丸; 五味子; 山茱萸; 五味子甲素; 五味子乙素; 五味子丙素; 熊果酸; RP-HPLC

中图分类号: R286.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2015)24-3691-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.24.014

Determination of deoxyschizandrin, schisandrin b, schisandrin c, and ursolic acid in Baogan Pill by RP-HPLC

LIU Hong-sheng¹, ZHANG Ya-min², WANG SHu-sen¹, SHEN ZHONG-yang¹, LIU Hong-li³

1. Key Laboratory of Emergency Medicine of Critical Disease of Healthful Ministry in First Central Hospital, Tianjin 300192, China

2. Department of Hepatobiliary Surgery in First Central Hospital, Tianjin 300192, China

3. Pharmaceutical secondary specialized schools in Tianjin 300462, China

Abstract: Objective To establish an RP-HPLC method for determining the contents of deoxyschizandrin, schisandrin b, schisandrin c, and ursolic acid in Baogan Pill, and to provide the quality guarantee for Baogan Pill. **Methods** Agilent Zorbax SB-C₁₈ (150 mm × 4.6 mm, 5 μm) column was used. Acetonitrile and 0.1% phosphoric acid water solution was used as mobile phase, the volume flow was at 1.0 mL/min; Ultraviolet wavelength was 210 nm; Column temperature was at 30 ℃, and injection volume was 10 μL. **Results** The lowest detection limits in deoxyschizandrin, schisandrin b, schisandrin c, and ursolic acid respectively were 0.016, 0.019, 0.020, and 0.025 mg/L, the linear ranges respectively were 3.906—250.000, 5.323—340.000, 3.225—205.000, and 5.323—340.000 mg/L. The average recoveries of deoxyschizandrin, schisandrin b, schisandrin c, and ursolic acid in Baogan Pill respectively were 100.79%, 101.09%, 101.26%, and 101.16%; The precision RSD values were 1.76%, 1.69%, 1.80%, and 1.86%, respectively; The repeatability RSD values were 1.77%, 1.66%, 1.49% and 1.56%, respectively; The stability RSD values were 1.61%, 1.39%, 1.60%, and 1.56%, respectively. The average amounts of deoxyschizandrin, schisandrin b, schisandrin c, and ursolic acid in the selected samples per pill were 0.444, 1.066, 0.3125, 1.068 μg, respectively. **Conclusion** The method is believable for determining the contents of deoxyschizandrin, schisandrin b, schisandrin c, and ursolic acid with good simplicity, sensibility, repeatability, and recovery rate.

Key words: Baogan pill; *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill.; *Cornus officinalis* Sieb. & Zucc.; deoxyschizandrin; schisandrin b; schisandrin c; ursolic acid; RP-HPLC

收稿日期: 2015-06-09

基金项目: 天津市应用基础与前沿技术研究计划 (14JCYBJC24800)

作者简介: 刘宏胜, 女, 主任药师, 硕士, 从事中药单体成分研究。E-mail: lhwmg@sina.com

*通信作者 张雅敏, 男, 主任医师, 博士、硕士生导师, 从事肝胆外科研究。

五味子甲、乙、丙素是五味子的主要活性成分,五味子甲、乙、丙素具有增强肝的解毒功能,增强肝细胞色素 P450 活性、并能促进肝蛋白质和糖原的生物合成,五味子乙素还能降低血清丙氨酸转氨酶 (ALT) 和天冬氨酸转氨酶 (AST),可见五味子甲、乙、丙素对肝脏具有保护作用^[1];熊果酸是山茱萸的主要活性成分,它们具有较好的抗氧化能力,可降低肝、脑组织的过氧化脂质量,清除氧自由基,在山茱萸发挥补益肝肾的功效中起重要作用。肝脏炎症、纤维化等慢性损伤会严重影响肝脏的功能及再生能力,进而影响临床肝癌的治疗效果。根据中医的藏象学说理论及临床药理学观察,以山茱萸、五味子、黄芩、三七等制成保肝丸^[2],其中山茱萸和五味子为君药。本实验采用 RP-HPLC 法检测保肝丸中五味子甲、乙、丙素及熊果酸的量,为控制保肝丸的质量提供依据。

1 仪器与材料

Agilent 1260 型高效液相色谱仪,包括四元泵, G1311C、自动进样器, G1329B、VWD 检测器, G1314F、色谱工作站,安捷伦科技有限公司; AE240 精密电子分析天平,梅特勒-上海托利多仪器;超纯水器,法国 MILLIPORE;万能粉碎机,北京中兴伟业仪器有限公司制造;超声提取器,宁波新艺生物科技股份有限公司;电热鼓风干燥箱,天津市三水科学仪器有限公司。

对照品五味子甲素(批号 20130306)、五味子乙素(批号 20130816)、五味子丙素(批号 20130306)及熊果酸(批号 20130406)均购自中国食品药品检定研究院,质量分数均 $\geq 99.9\%$ 。乙腈(色谱纯),德国 Merck 公司;磷酸(色谱纯),天津市光复精细化工研究所;乙醇(色谱纯),天津市北联精细化学品开发有限公司;实验用水为二次纯化水,天津市第一中心医院药厂提供。五味子药材(批号 1305001)、山茱萸(批号 1206001),中国安国市昌达中药材饮片有限公司,经天津中医药大学李天祥副教授鉴定分别为木兰科植物五味子 *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. 的干燥成熟果实和山茱萸科植物山茱萸 *Cornus officinalis* Sieb. et Zucc. 的干燥成熟果肉;5 批保肝丸样品由天津市第一中心医院卫生部危重病急救医学重点实验室自行研制,批号分别为 20141205、20141219、20141226、20150109、20150116。每丸含生药为 2.605 mg。

2 方法与结果

2.1 保肝丸的处理

2.1.1 保肝丸供试品溶液的制备 取保肝丸 10 粒,精密称定质量为 5.60 mg,按 1:10 比例加入 85% 乙醇,在 250 W、40 kHz、20 °C 条件下,超声提取 30 min,称定质量,用 85% 乙醇填补损失的质量。滤液过 0.22 μm 微孔滤膜,进样 10 μL 。

2.1.2 保肝丸缺五味子的阴性对照溶液的制备 按保肝丸的制备方法,按比例精密称取除五味子外的各味中药,按 1:10 比例加入 85% 乙醇,其余操作同“2.1.1”项。

2.1.3 保肝丸缺山茱萸的阴性对照溶液的制备 按保肝丸的制备方法,按比例精密称取除山茱萸外的各味中药,按 1:10 比例加入 85% 乙醇,其余操作同“2.1.1”项。

2.2 色谱条件

色谱柱为 ZORBAX SB-C₁₈ (150 mm \times 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱。流动相为乙腈-0.1% 磷酸水溶液 (67:33),体积流量 1.0 mL/min;紫外检测波长 210 nm;柱温 30 °C;进样量 10 μL 。

2.3 标准曲线的绘制

分别精密称取对照品熊果酸 1.36 mg、五味子甲素 1.0 mg、五味子乙素 1.36 mg、五味子丙素 0.82 mg,配成 1 mL 的无水乙醇混合对照品溶液,并进行倍比稀释。得到稀释液,其中熊果酸质量浓度分别为 680、340、170、85、42.5、21.25、10.625、5.313 mg/L;五味子甲素质量浓度分别为 500、250、125、62.5、31.25、15.625、7.812、3.906 mg/L;五味子乙素质量浓度分别为 680、340、170、85、42.5、21.25、10.625、5.313 mg/L;五味子丙素质量浓度分别为 410、205、102.5、51.25、25.625、12.810、6.450、3.225 mg/L。各质量浓度液体分别过 0.22 μm 微孔滤膜,进样 10 μL 进行色谱分析。以峰面积值 (A) 对质量浓度 (C) 进行线性回归,得熊果酸回归方程: $A=6.135 C+18.700$, $r=0.999 5$,熊果酸在 340~5.323 mg/L 与峰面积呈良好的线性关系;五味子甲素回归方程: $A=79.196 C+196.449$, $r=0.999 4$,五味子甲素在 250~3.906 mg/L 与峰面积呈良好的线性关系;五味子乙素回归方程: $A=22.085 C+66.829$, $r=0.999 5$,五味子乙素在 340.000~5.323 mg/L 与峰面积呈良好的线性关系;得五味子丙素回归方程: $A=23.106 C+43.569$, $r=0.999 5$,五味子丙素在 205.000~3.225 mg/L 与峰面积呈良好的线性

关系。按照信噪比 3 : 1, 熊果酸及五味子甲、乙、丙素最低检测质量浓度分别为 0.025、0.016、0.019、0.020 mg/L。

2.4 色谱分离

分别对供试样本中的熊果酸及五味子甲、乙、丙素进行色谱分离, 结果见图 1-A、B。可见, 各组分

的分离均能达到基线分离, 峰型对称, 分离度好, 且无明显杂质峰干扰。分别做供试样本阴性对照试验, 结果见图 1-C、D。可见, 在五味子甲、乙、丙素相应保留时间内没有检测相应的色谱峰(图 1-C); 在熊果酸相应保留时间内没有检测到相应色谱峰(图 1-D)。说明在检测这4种单体成分时没有干扰峰出现。

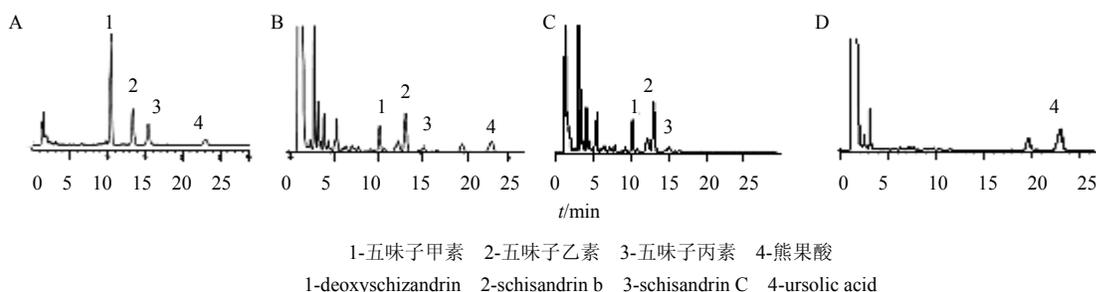


图 1 混合对照品 (A)、供试样品 (B)、缺山茶萸 (C) 和缺五味子 (D) 的阴性对照的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC of mixed reference substances (A), samples (B), negative control solution without *S. chinensis* (C) or *S. officinalis* (D)

2.5 精密度试验

取五味子甲、乙、丙素及熊果酸质量浓度分别为 15.620、21.25、25.625、21.25 mg/L 的混合对照品溶液, 连续进样 5 次, 结果五味子甲、乙、丙素及熊果酸峰面积的 RSD 分别为 1.76%、1.69%、1.80% 和 1.86%。

2.6 重复性试验

取同一批保肝丸(批号 20150109), 按“2.1.1”项方法平行制备 6 份供试品溶液, 进样测定, 结果五味子甲、乙、丙素及熊果酸质量分数的 RSD 分别为 1.77%、1.66%、1.49%和 1.56%。

2.7 稳定性试验

取同一批保肝丸(批号 20150109), 按“2.1.1”项方法处理后, 分别在 0、4、8、12、24、48 h 进样测定, 结果五味子甲、乙、丙素及熊果酸峰面积的 RSD 分别 1.61%、1.39%、1.60%和为 1.56%, 表明供试样本 48 h 内稳定。

2.8 加样回收率试验

取已测定的保肝丸(批号 20150109) 5 粒, 精密称定, 平行 9 份, 均分为 3 组, 分别加入 0.1 mL 混合对照品溶液(五味子甲素质量浓度分别为 7.812、15.620、31.25 mg/L; 五味子乙素质量浓度分别为 10.625、21.25、42.5 mg/L; 五味子丙素质量浓度分别为 6.406、12.813、25.625 mg/L; 熊果酸质量浓度分别为 10.625、21.25、42.5 mg/L), 按照“2.1.1”项方法处理后按“2.2”项色谱条件进样分

析。结果五味子甲、乙、丙素及熊果酸的平均回收率分别 100.79%、101.09%、101.26%和 101.16%, RSD 分别为 1.41%、1.49%、1.31%和 1.36%。

2.9 样品测定

5 批保肝丸样品, 按照“2.1.1”项方法处理, 按“2.2”项色谱条件测定, 结果见表 1。结果保肝丸(0.560 mg) 含五味子甲、乙、丙素及熊果酸的平均量分别为 0.444、1.066、0.3125、1.068 μg/丸, 见表 1。

表 1 样本测定结果

编号	质量分数/(μg·丸 ⁻¹)			
	五味子甲素	五味子乙素	五味子丙素	熊果酸
1	0.443	1.054	0.3103	1.064
2	0.439	1.079	0.3149	1.072
3	0.446	1.072	0.3162	1.061
4	0.449	1.078	0.3123	1.075
5	0.441	1.047	0.3090	1.067
平均值	0.444	1.066	0.3125	1.068

3 讨论

保肝丸中君药为五味子、山茱萸。此药功能齐全, 五味俱有, 故有五味子之称。最早列于《神农本草经》上品, 中药功效在于滋补强壮之力, 药用价值极高。五味子甲、乙、丙素是五味子中最为重要的活性单体成分^[3]; 山茱萸为落叶乔木或小乔木, 干燥成熟果肉入药。《本草纲目》载: “山茱萸, 主

治心下邪气寒热，温中，逐寒温痹，去三虫，久服轻身；有强阴益精、安五脏、通九窍、止小便淋沥之功；久服明目、强力长年”。熊果酸是山茱萸发挥药理活性最为重要的单体成分。五味子与山茱萸在保肝丸中相互配合、协同发挥补肝、强肝、益肝之效。

通过对五味子甲、乙、丙素及熊果酸进行紫外扫描得知五味子甲、乙、丙素在 190~300 nm、熊果酸在 190~230 nm 均有紫外吸收。但经过比较发现，在 210 nm 处 4 种单体成分均有最大紫外吸收值。因此，将 210 nm 作为 4 种成分的检测波长。

通过分析 4 种单体成分的结构组成，分别尝试使用甲醇与水、乙腈与水、甲醇与冰醋酸、乙腈与冰醋酸等不同比例溶液作为流动相；及采用不同流速、调节柱温等条件实施熊果酸及五味子甲、乙、丙素的色谱分析。结果发现，流动相为乙腈-0.1%磷酸水溶液（67：33），体积流量 1.0 mL/min；紫外检测波长 210 nm；柱温 30 ℃时，4 种单体成分能完全分离，且出峰时间控制在 25 min 内，分离度高，

基线平稳，峰型对称，达到检测分离熊果酸及五味子甲、乙、丙素的目的。

前期研究对保肝丸组方药材、三七及黄芩中的主要成分进行定量分析，本实验对保肝丸中五味子及山茱萸中主要成分进行定量分析，建立的 RP-HPLC 方法简单快速，灵敏度高，数据准确可靠，为保肝丸的制剂质量控制提供了参考。同时，也为临床检测富含熊果酸及五味子甲、乙、丙素的制剂提供了良好的检测手段。

参考文献

- [1] 胡俊扬, 陆兔林, 毛春芹, 等. HPLC 同时测定不同产地五味子 8 种木脂素类成分 [J]. 中成药, 2012, 34(2): 313-316.
- [2] 韩根利, 刘宏胜, 张雅敏. RP-HPLC 法测定保肝丸中马钱素、芍药苷和黄芩素 [J]. 中草药, 2015, 46(3): 374-377.
- [3] 刘 芷, 贾 英, 赵 旭, 等. 五味子的 UPLC 指纹图谱研究 [J]. 中草药, 2014, 45(11): 1631-1633.
- [4] 刘宏胜, 吴胜群. RP-HPLC 法测定人血液和尿液中草酸 [J]. 中草药, 2014, 45(20): 2935-2938.