

RP-HPLC 法测定保肝丸中马钱素、芍药苷和黄芩素

韩根利¹, 刘宏胜^{2*}, 张雅敏³

1. 天津市第一中心医院 药学部, 天津 300192

2. 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

3. 天津市第一中心医院 肝胆外科, 天津 300192

摘要: **目的** 建立反相-高效液相色谱(RP-HPLC)法测定保肝丸中马钱素、芍药苷和黄芩素的量, 为保肝丸应用于对伴有基础肝病肝脏的保护与再生作用的动物实验提供质量保证。**方法** 采用安捷伦 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, 梯度洗脱, 体积流量 1.0 mL/min; 紫外检测波长马钱素与芍药苷为 236 nm, 黄芩素为 278 nm; 柱温 30 ℃; 进样量为 5 μL。**结果** 马钱素的最低检测质量浓度为 14.3 μg/L, 线性范围为 7.305~233.750 mg/L, 精密度 RSD 为 1.69%; 芍药苷的最低检测质量浓度为 30.9 μg/L, 线性范围为 5.742~183.750 mg/L, 精密度 RSD 为 1.86%; 黄芩素的最低检测质量浓度为 36.4 μg/L, 线性范围为 3.711~118.750 mg/L, 精密度 RSD 为 1.76%; 保肝丸中马钱素的平均回收率为 99.2%, RSD 为 1.66%; 芍药苷的平均回收率为 98.9%, RSD 为 1.82%; 黄芩素的平均回收率为 100.6%, RSD 为 1.90%。**结论** 该方法简便、灵敏度高、重复性好、平均回收率高, 是检测马钱素、芍药苷和黄芩素质量浓度的可信方法。

关键词: 保肝丸; RP-HPLC; 马钱素; 芍药苷; 黄芩素

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2015)03-0374-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.03.013

Determination of loganin, paeoniflorin, and baicalein in Baogan Pills by RP-HPLC

HAN Gen-li¹, LIU-Hong-sheng², ZHANG Ya-min³

1. Department of Pharmacy, First Central Hospital, Tianjin 300192, China

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

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

Abstract: **Objective** To establish a method of RP-HPLC for determining the mass concentration of loganin, paeoniflorin and baicalein in Baogan Pills, and it has provided the quality guarantee for the animal experiment which applied to the liver protection and reproductive function together with the basis of liver disease. **Methods** Agilent Zorbax SB-C₁₈ (150 mm × 4.6 mm, 5 μm) column was used. Acetonitrile and 0.1% phosphoric acid water-solution were used as mobile phase in gradient elution. The volume flow was at 1.0 mL/min; ultraviolet detection wavelength was 236 nm when loganin and paeoniflorin were detected, and was 278 nm when baicalein was detected; Column temperature was at 30 ℃ and injection volume was 5 μL. **Results** The lowest detection limit in loganin was 14.3 μg/L, the linear range was 7.305—233.750 mg/L, and its RSD was 1.69%; The lowest detection limit in paeoniflorin was 30.9 μg/L, the linear range was 5.742—183.750 mg/L, and its RSD was 1.86%; The lowest detection limit in baicalein was 36.4 μg/L, the linear range was 3.711—118.750 mg/L, and its RSD was 1.76%. The average recovery of loganin in Baogan Pills was 99.2%, and its RSD was 1.66%; The average recovery of paeoniflorin was 98.9%, and its RSD was 1.82%; The average recovery of baicalein in was 100.6%, and its RSD was 1.90%. **Conclusion** The method is believable for determining the mass concentration of loganin, paeoniflorin, and baicalein with its simplicity, sensibility, repeatability, and better recovery rate.

Key words: Baogan Pills; RP-HPLC; loganin; paeoniflorin; baicalein

收稿日期: 2014-07-26

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: 韩根利, 男, 执业中药师, 主管中药师, 从事临床中药学研究。

*通信作者 刘宏胜, 女, 主任药师, 从事中药制剂、精油提取及中药单体成分体外抑制肿瘤细胞增殖的有关分子生物学研究。

E-mail: lhwmg@sina.com

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。本研究根据中医的藏象学说理论及临床药理学观察,以山茱萸、白芍、三七、黄芩等制成保肝丸。马钱素是山茱萸的主要活性成分,具有较好的抗氧化能力,可降低肝、脑组织的过氧化脂质水平,能清除氧自由基,在山茱萸发挥补益肝肾的功效中起主要作用;芍药苷是白芍中的主要成分,具有扩张血管、抗血栓形成、调节免疫等功能,特别是能明显对抗四氯化碳所致的小鼠肝损伤后血清丙氨酸转氨酶升高及血清白蛋白下降和肝糖原水平下降的改善和恢复;黄芩素是黄芩中的主要成分,它属于黄酮类化合物中的一种,具有抗病原微生物、抗炎、抗病素、保肝、利胆、调脂、提高免疫力等功效。这3种单体成分对于该制剂发挥益肝、保肝功效起着重要作用。因而,本实验采用 RP-HPLC 法检测保肝丸中马钱素、芍药苷与黄芩素的量,为评价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 公司;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。

马钱素对照品,南昌品正商贸有限公司,质量分数不少于 99.9%,批号 20140306;芍药苷对照品,中国食品药品检定研究院,质量分数不少于 99.9%,批号 20130406;黄芩素对照品,南昌品正商贸有限公司,质量分数不少于 99.9%,批号 20130609。乙腈(色谱纯),德国 Merk 公司;磷酸(色谱纯),天津市光复精细化工研究所;实验用水为二次纯化水,天津市第一中心医院药厂提供。保肝丸样品(含白芍、黄芩、山茱萸、三七、五味子等药味),天津市第一中心医院重点实验室自行研制,批号 20140710、20140729、20140819、20140909、20140929、20141026。

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 2 粒,精密称定质量为 1.2 mg,按 1:10 比例加入溶剂无

水乙醇,在 250 W、40 kHz、20℃ 条件下,超声提取 30 min,称质量,用乙醇填补缺失的质量。滤液过 0.22 μm 微孔滤膜,进样 5 μL。

2.1.2 保肝丸缺失马钱素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诸味中药,按 1:10 比例加入溶剂无水乙醇,其余操作同“2.1.1”项。

2.1.3 保肝丸缺失芍药苷的阴性对照溶液的制备 按保肝丸的制备方法,按比例精密称取除白芍外的诸味中药,按 1:10 比例加入溶剂无水乙醇,其余操作同“2.1.1”项。

2.1.4 保肝丸缺失黄芩素的阴性对照溶液的制备 按保肝丸的制备方法,按比例精密称取除黄芩外的诸味中药,按 1:10 比例加入溶剂无水乙醇,其余操作同“2.1.1”项。

2.2 色谱条件

色谱柱为 Zorbax SB-C₁₈ 柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相为乙腈-0.1%磷酸水溶液,梯度洗脱:0~15 min,14%~16.5%乙腈;15~30 min,16.5%~80%乙腈;30~31 min,80%~14%乙腈;波长在 0~15 min 时为 236 nm,以后变为 278 nm;体积流量 1.0 mL/min;柱温 30℃;进样量 5 μL。

2.3 标准曲线的制备

分别精密称取马钱素、芍药苷和黄芩素对照品 1.87、1.47、0.95 mg 用 1 mL 无水乙醇溶解,配成马钱素为 1 870 mg/L、芍药苷为 1 470 mg/L、黄芩素为 950 mg/L 的混合对照品溶液。倍比稀释成马钱素质量浓度为 1 870、935、467.5、233.75、116.875、58.438、29.219、14.609、7.305 mg/L;芍药苷质量浓度为 1 470、735、367.5、183.75、91.875、45.938、22.969、11.484、5.742 mg/L;黄芩素质量浓度为 950、475、237.5、118.75、59.375、29.688、14.844、7.422、3.711 mg/L 对照品溶液,各单体对照品前 2 个质量浓度对照品溶液置冰箱保存备用,取后 6 个质量浓度对照品溶液作标准曲线。各质量浓度液体分别过 0.22 μm 微孔滤膜后进样 5 μL 进行色谱分析。以峰面积(A)对浓度 C(mg/L)进行线性回归,得马钱素标准曲线 $A=6.419C+28.149$, $r=0.9996$;得芍药苷标准曲线 $A=6.877C+16.409$, $r=0.9997$;得黄芩素标准曲线 $A=31.297C+45.631$, $r=0.9998$;可见马钱素在 7.305~233.75 mg/L,芍药苷在 5.742~183.75 mg/L,黄芩素在 3.711~118.75 mg/L 质量浓度与峰面积均呈良好的线性关系。按照信噪

比 3/1, 马钱素最低检测质量浓度为 14.3 $\mu\text{g/L}$; 芍药苷最低检测质量浓度为 30.9 $\mu\text{g/L}$; 黄芩素最低检测质量浓度为 36.4 $\mu\text{g/L}$ 。

2.4 色谱分离

分别对保肝丸中马钱素、芍药苷与黄芩素进行色谱分离, 结果见图 1。可见, 马钱素、芍药苷与黄芩素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。马钱素的保留时间为 4.512 min、芍药苷的保留时间为 7.534 min、黄芩素

的保留时间为 24.183 min。

分别进行保肝丸中马钱素、芍药苷与黄芩素阴性对照试验, 结果见图 1。可见, 在马钱素、芍药苷与黄芩素色谱峰处没有其他色谱峰干扰。

2.5 精密度试验

取马钱素 58.438 mg/L、芍药苷 45.938 mg/L 和黄芩素 29.688 mg/L 的混合对照品溶液, 连续进样 5 次, 结果马钱素、芍药苷和黄芩素峰面积的 RSD 分别为 1.69%、1.86%和 1.76%。

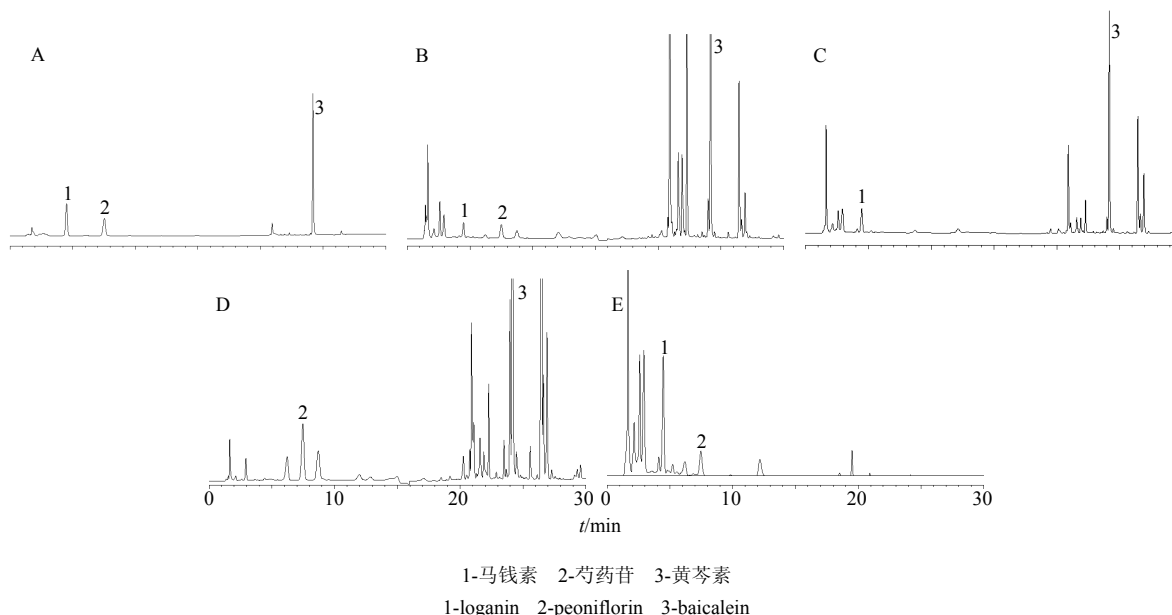


图 1 马钱素、芍药苷和黄芩素对照品 (A)、保肝丸样品 (B)、缺失白芍 (C)、缺失山茱萸 (D) 和缺失黄芩 (E) 的保肝丸阴性对照的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC of loganin, paeoniflorin, and baicalein reference substances (A), and Baogan Pills samples (B), negative reference substance without *Paeoniae Radix* (C), *Fructus Radix* (D), and *Scutellaria Radix* (E) in Baogan Pills

2.6 稳定性试验

取同一批保肝丸 (批号 20140909), 按 “2.1.1” 项方法处理后, 分别在 0、4、8、12、24、48 h 进样测定, 结果马钱素、芍药苷和黄芩素峰面积的 RSD 分别为 1.46%、1.73%和 1.55%, 表明供试品溶液在 48 h 内稳定。

2.7 重复性试验

取同一批保肝丸 (批号 20140909), 按 “2.1.1” 项方法平行制备 6 份供试品溶液, 进样测定, 结果马钱素、芍药苷和黄芩素质量分数的 RSD 分别为 1.56%、1.77%和 1.89%。

2.8 加样回收率试验

精密称取已测定的保肝丸 0.5 g 溶解在 3.5 mL 无水乙醇溶液中, 按照 “2.1.1” 项方法超声提取后称质量, 用乙醇补足缺失的质量。按 0.9 mL (含有

马钱素为 14.614 mg/L、芍药苷为 15.638 mg/L、黄芩素为 33.362 mg/L) 分别加入到 3 个 1.5 mL EP 管中, 在每个 EP 管中再加入 0.1 mL 混合对照品溶液, 马钱素质量浓度分别为 29.219、58.438、116.875 mg/L; 芍药苷质量浓度分别为 22.969、45.938、91.875 mg/L; 黄芩素质量浓度分别为 14.844、29.688、59.375 mg/L。进样测得其相应单体成分的质量浓度, 计算其平均回收率, 结果马钱素平均回收率为 99.2%, RSD 为 1.66%; 芍药苷平均回收率为 98.9%, RSD 为 1.82%; 黄芩素平均回收率为 100.6%, RSD 为 1.90%。

2.9 样品测定

取 6 批保肝丸样品, 按 “2.1.1” 项方法处理, 按 “2.2” 项色谱条件进行测定, 结果见表 1。结果表明保肝丸马钱素的平均量为 96.71 g/L; 芍药苷的

表1 样品测定结果
Table 1 Determination results of sample

批号	质量浓度/(mg·L ⁻¹)		
	马钱素	芍药苷	黄芩素
20140710	96.99	50.16	186.66
20140729	97.10	50.76	186.99
20140819	96.89	50.95	186.70
20140909	96.60	50.50	186.90
20140929	96.41	50.89	185.99
20141026	96.31	50.39	186.55

平均量为 50.61 g/L; 黄芩素的平均量为 186.63 g/L。

3 讨论

当今,肝脏疾病严重威胁着人类的健康与生存。这些疾病包括各种原因导致的肝炎(病毒性、脂肪性、药物性和自身免疫性)、肝纤维硬化和肝癌。与其他器官不同,肝脏是唯一自身有强大再生能力的器官。肝脏虽然具有强大的再生功能,但是相对于慢性肝炎、高脂饮食和酒精滥用引起的慢性损伤而言,这种肝细胞的自我修复能力是远远不够的。而且长期慢性损伤再生还可能引发肝癌。肝癌中最常见的为肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)。HCC 是第3大肿瘤死亡原因,每年的死亡数高达一百万^[1-2]。外科手术被认为是最佳的治疗方法,但仅有部分早期 HCC 且肝功能良好的患者才适合手术,大部分病人由于基础肝脏疾病或者病变范围过大,限制了手术的开展。

传统中医药凭借其博大精深的理论基础,整体观念与辨证论治的特色,对伴有基础肝病的肝损伤、肝纤维化等疾患具有良好的恢复与促进肝细胞再生的作用。马钱素、芍药苷和黄芩素是保肝丸对抗小鼠肝损伤、肝纤维化的主要活性成分,准确测定其

量是保证制剂质量的关键所在。本研究通过对马钱素、芍药苷和黄芩素进行紫外可变波长扫描,发现马钱素和芍药苷在 236 nm 均有较大的吸收;黄芩素在 278 nm 有较大的吸收。因而,将 236 nm 和 278 nm 作为马钱素、芍药苷和黄芩素的检测波长。

白芍中的活性成分芍药苷在酸性环境中稳定,因而选择 0.1%磷酸水溶液(pH 2~3)与洗脱能力较强的乙腈作为流动相,而且其他 2 种成分马钱素和黄芩素在此洗脱条件下也得到很好的分离^[3-5]。

本实验方法简单快速,得到的色谱峰形对称性好,分离度佳,达到基线分离,因而实验数据准确可靠。本研究采用 RP-HPLC 法采用梯度洗脱、变换波长,同时检测马钱素、芍药苷和黄芩素的量,不仅为保肝丸应用于对伴有基础肝病肝脏的保护与再生作用的动物实验提供了质量保证,而且也为其其他以此 3 种单体成分为质量检测指标的中药制剂提供了检测方法。

参考文献

- [1] Michalopoulos G K. Liver regeneration after partial hepatectomy: critical analysis of mechanistic dilemmas [J]. *Am J Pathol*, 2010, 176(1): 2-13.
- [2] Yang J D, Roberts L R. Hepatocellular carcinoma: A global view [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2010, 7(8): 448-458.
- [3] 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.
- [4] 韦建华, 李耀华, 蔡少芳, 等. HPLC 测定柿子中齐墩果酸与熊果酸的含量 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2010, 16(13): 48-50.
- [5] 李春红, 梅志强, 何兵, 等. HPLC 同时测定龙胆泻肝制剂中黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素的含量 [J]. *生物学通报*, 2012, 47(4): 60-62.