RP-HPLC 法测定保肝丸中三七皂苷 R_1、人参皂苷 Rg_1 和 Rb_1 及野黄芩苷

刘宏胜[1]，王树森[1*]，张雅敏[2]，刘子荣[2]，赵晨翔[2]

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

摘 要：目的 建立 RP-HPLC 法测定保肝丸中三七皂苷 R_1、人参皂苷 Rg_1、人参皂苷 Rb_1 和野黄芩苷的量，对保肝丸的制剂质量提供保障。**方法** 采用安捷伦 Zorbax SB-C_{18}（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；紫外检测波长为 203 nm；柱温 30 ℃；进样量为 5 μL。**结果** 三七皂苷 R_1、人参皂苷 Rg_1、人参皂苷 Rb_1 和野黄芩苷的最低检测质量浓度分别为 0.287、0.126、0.182、0.305 mg/L，线性范围分别为 4.427～141.668、6.055～193.750、3.255～104.167、5.729～183.333 mg/L。供试样品中三七皂苷 R_1、人参皂苷 Rg_1、人参皂苷 Rb_1 和野黄芩苷的平均回收率分别为 101.76%、99.66%、99.43%、101.26%；精密度 RSD 分别为 1.81%、1.79%、1.39%、1.51%；重复性试验 RSD 分别为 1.71%、1.86%、0.97%、1.63%；稳定性试验 RSD 分别为 1.62%、1.25%、1.10%、1.41%。供试样品每丸含三七皂苷 R_1、人参皂苷 Rg_1、人参皂苷 Rb_1 和野黄芩苷的平均量分别为 4.303、31.729、20.776、1.071 μg。**结论** 该方法简便、灵敏度高、重复性好、平均回收率高，是检测三七皂苷 R_1、人参皂苷 Rg_1、人参皂苷 Rb_1 和野黄芩苷质量浓度的可信方法。

关键词： 保肝丸；RP-HPLC；三七皂苷 R_1；人参皂苷 Rg_1；人参皂苷 Rb_1；野黄芩苷

中图分类号： R286.02 **文献标志码：** A **文章编号：** 0253 - 2670(2015)16 - 2417 - 04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.16.013

Determination of notoginsenoside R_1, ginsenoside Rg_1, Rb_1, and scutellarin in Baogan Pill by RP-HPLC

LIU Hong-sheng[1], WANG Shu-sen[1], ZHANG Ya-min[2], LIU Zi-rong[2], ZHAO Chen-xiang[2]

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

Abstract: Objective To establish an RP-HPLC method for determining the mass concentration of notoginsenoside R_1, ginsenoside Rg_1, Rb_1, and scutellarin in Baogan Pill, and to provide the quality guarantee for Baogan Pill. **Methods** Agilent Zorbax SB-C_{18} (150 mm × 46 mm, 5 μm) column were used. Acetonitrile and 0.1% phosphoric acid water-solution were used as mobile phase of gradient elution, the volume flow was at 1.0 mL/min; Ultraviolent determination wavelength was 203 nm; Column temperature was at 30 ℃, and injection volume was 5 μL. **Results** The lowest detection limit in notoginsenoside R_1 was 0.287 mg/L, the linear range was 4.427—141.668 mg/L; The lowest detection limit in ginsenoside Rg_1 was 0.182 mg/L, the linear range was 6.055—193.75 mg/L; The lowest detection limit in ginsenoside Rb_1 was 0.182 mg/L, the linear range was 3.255—104.167 mg/L; The lowest detection limit in scutellarin was 0.305 mg/L, the linear range was 5.729—183.333 mg/L. The average recovery of notoginsenoside R_1, ginsenoside Rg_1, Rb_1 and scutellarin in Baogan Pill respectively were 101.76%, 99.66%, 99.43%, and 101.26%; The precision RSD values respectively were 1.81%, 1.79%, 1.39%, and 1.51%; The repeatability RSD values respectively were 1.71%, 1.86%, 0.97%, and 1.63%; The stability RSD values respectively were 1.62%, 1.25%, 1.10%, and 1.41%. The average amounts of notoginsenoside R_1, ginsenoside Rg_1, Rb_1, and scutellarin in the selected samples per pill respectively were 4.303, 31.729, 20.776, and 1.071 μg. **Conclusion** The method is believable for determining the mass concentration of R_1, Rg_1, Rb_1, and scutellarin with its simplicity, sensibility, repeatability, and better recovery rate.

Key words: Baogan Pill; RP-HPLC; notoginsenoside R_1; ginsenoside Rg_1; ginsenoside Rb_1; scutellarin

收稿日期： 2015-03-05

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，硕士，主任药师，从事中药制剂和 RP-HPLC 成分分析等研究。E-mail: lhswmg@sina.com

***通信作者** 王树森，男，博士，副教授，硕士生导师，实验室主任，从事胰岛移植等研究。

肝脏病学（hepatology）是从消化病学（gastroenterology）中逐渐发展和独立出来的临床学科，其内容主要包括遗传代谢性肝病、自身免疫性及胆汁淤积性肝病、病毒性肝炎及化学损伤性肝病（酒精、药物、毒物等）。治疗手段主要有化学药物、生物制剂、微创介入、外科手术及肝移植等[1]。

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。观察验证该制剂对伴有肝脏炎症、纤维化、损伤等基础肝病时肝脏的保护与再生作用。

三七皂苷 R_1、人参皂苷 Rg_1 及人参皂苷 Rb_1 是三七发挥药理作用的主要单体成分[2]，具有抑制血小板聚集、抗血栓、扩张血管、抗心肌缺血、抗心律失常、抗炎、抗动脉粥样硬化等作用。其中人参皂苷 Rg_1、人参皂苷 Rb_1 可以显著降低 CCl_4 造成的小鼠肝纤维化的丙氨酸转氨酶（ALT）、透明质酸（HA）及 III 型前胶原的水平；还可以增加 ^{3}H-亮氨酸对肝脏蛋白质的掺入速率及增加 ^{3}H-胸腺嘧啶核苷对受损肝脏脱氧核酸的掺入速率，表明其促进肝修复的作用与促进核酸及蛋白质的合成有关。三七皂苷 R_1、人参皂苷 Rg_1 及人参皂苷 Rb_1 可明显降低 CCl_4 造成的小鼠肝损伤的 ALT、天冬氨酸转氨酶（AST）及乳酸脱氢酶（LDH）的水平[3]。野黄芩苷是黄芩中的主要成分，属于黄酮类化合物，具有抑制肿瘤细胞活性，抗血小板聚集，降低脑血管阻力，改善脑血循环等功效[4]。与黄芩苷、黄芩素[5]协同发挥对抗肝纤维化、肝损伤的药理作用。

本实验采用 RP-HPLC 法检测保肝丸中三七皂苷 R_1、人参皂苷 Rg_1、人参皂苷 Rb_1 和野黄芩苷的质量浓度，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。

对照品三七皂苷 R_1（批号 20140527）、人参皂苷 Rg_1（批号 20130906）、人参皂苷 Rb_1（批号 20140619）和野黄芩苷（批号 20140327）均购自中国食品药品检定研究院，质量分数均≥99.9%。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；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。三七药材（产品批号 1306001）、黄芩药材（产品批号 1309001），中国安国市昌达中药材饮片有限公司，经笔者鉴定分别为为五加科人参属植物三七 *Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen 的干燥根和根茎、唇形科黄芩属植物黄芩 *Scutellaria baicalensis* Georgi 的干燥根；保肝丸样品（由白芍、黄芩、山茱萸、三七、五味子等药材制备而成），天津市第一中心医院重点实验室自行研制，批号分别为 20141205、20141219、20141226、20150109、20150116。

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 5.56 mg，按 1∶10 比例加入 85% 乙醇，在 250 W、40 kHz、20 ℃条件下，超声提取 30 min，称质量，用 85%乙醇填补损失的质量。滤液过 0.22 μm 微孔滤膜，进样 5 μL。

2.1.2 保肝丸缺黄芩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 保肝丸缺三七的阴性对照溶液的制备 按保肝丸的制备方法，按比例精密称取除三七外的各味中药，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-C_{18} 柱（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：0～11.5 min，21.5%乙腈；11.5～14.5 min，21.5%～25.5%乙腈；14.5～24.5 min，25.5%～29.0%乙腈；24.5～34.5 min，29.0%～33.0%乙腈；34.5～39 min，33.0%～21.5%乙腈；检测波长为 203 nm；体积流量 1.0 mL/min；柱温 30 ℃；进样量 5 μL。

2.3 标准曲线的绘制

分别精密称取三七皂苷 R_1、人参皂苷 Rg_1、人参皂苷 Rb_1 和野黄芩苷对照品 0.68、0.93、0.50、0.88 mg，配成 1.2 mL 的混合对照品乙醇溶液，并进行倍比稀释，得到三七皂苷 R_1 的质量浓度分别为 141.668、70.834、35.417、17.708、8.854、4.427 mg/L；人参皂苷 Rg_1 的质量浓度分别为 193.750、96.875、

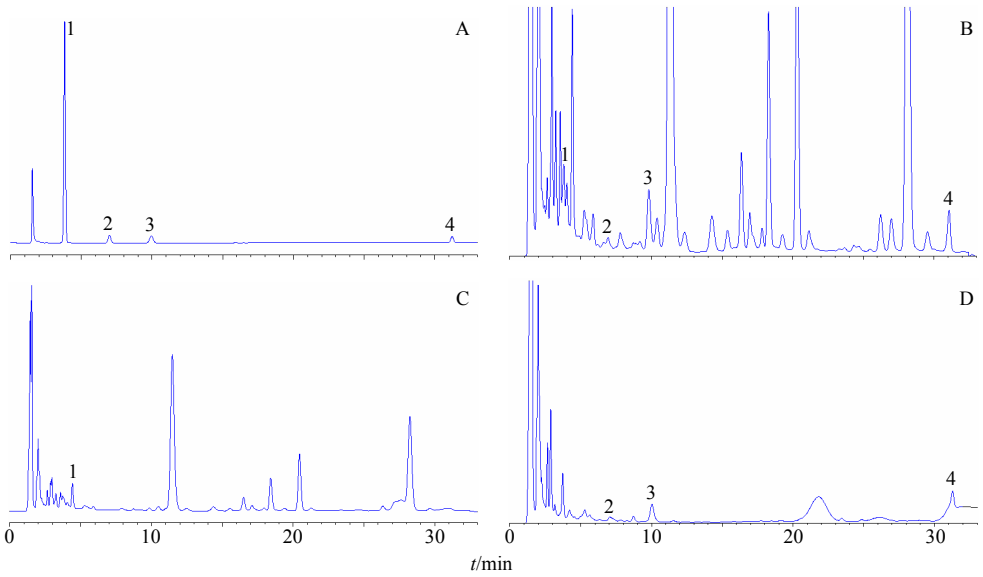
48.438、24.219、12.109、6.055 mg/L；人参皂苷 Rb_1 的质量浓度分别为 104.167、52.083、26.042、13.021、6.510、3.255 mg/L；野黄芩苷的质量浓度分别为 183.333、91.666、45.833、22.917、11.458、5.729 mg/L；分别过 0.22 μm 微孔滤膜，进样 5 μL 进行色谱分析。以峰面积积分值（A）对质量浓度（C）进行线性回归，得三七皂苷 R_1 回归方程：A＝1.425 C＋0.272，r＝0.999 1，三七皂苷 R_1 在 141.668～4.427 mg/L 与峰面积呈良好的线性关系；人参皂苷 Rg_1 回归方程：A＝1.247 C＋5.565，r＝0.999 4，人参皂苷 Rg_1 在 193.75～6.055 mg/L 与峰面积呈良好的线性关系；人参皂苷 Rb_1 回归方程：A＝1.472 C＋3.735，r＝0.999 5，人参皂苷 Rb_1 在 104.167～3.906 mg/L 与峰面积呈良好的线性关系；野黄芩苷回归方程：A＝17.625 C－90.587，r＝0.999 8，野黄芩苷在 183.333～5.729 mg/L 与峰面积呈良好的线性关系；按照信噪比 3∶1，三七皂苷 R_1、人参皂苷 Rg_1、人参皂苷 Rb_1 和野黄芩苷最低检测质量浓度分别为 0.287、0.126、0.182、0.305 mg/L。

2.4 色谱分离

分别对供试品中的三七皂苷 R_1、人参皂苷 Rg_1、人参皂苷 Rb_1 和野黄芩苷进行色谱分离，结果见图 1。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。三七皂苷 R_1 的保留时间为 6.997 min，人参皂苷 Rg_1 的保留时间为 9.957 min，人参皂苷 Rb_1 的保留时间为 31.222 min，野黄芩苷的保留时间为 3.824 min。分别做供试样品阴性对照试验，结果见图 1。可见，没有相应的干扰色谱峰出现。

2.5 精密度试验

取三七皂苷 R_1 17.708 mg/L、人参皂苷 Rg_1 24.219 mg/L、人参皂苷 Rb_1 13.021 mg/L 和野黄芩苷 22.917 mg/L 的混合对照品溶液，连续进样 5 次，结果三七皂苷 R_1、人参皂苷 Rg_1、人参皂苷 Rb_1 和野黄芩苷峰面积的 RSD 分别为 1.89%、1.57%、1.06%和 1.69%。



1-野黄芩苷 2-三七皂苷 R_1 3-人参皂苷 Rg_1 4-人参皂苷 Rb_1

1-scutellarin 2-notoginsenoside R_1 3-ginsenoside Rg_1 4-ginsenoside Rb_1

图 1 混合对照品 (A)、保肝丸样品 (B)、缺黄芩 (C) 和缺三七 (D) 的保肝丸阴性对照的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC of mixed reference substances (A), Baogan Pill (B), and Baogan Pill negative control solution lack of *Scutellaria* (D) and lack of *Notoginseng* (C)

2.6 稳定性试验

取同一批保肝丸（批号 20150116），按“2.1.1”项方法处理后，分别在 0、4、8、12、24、48 h 进样测定，结果三七皂苷 R_1、人参皂苷 Rg_1、人参皂苷 Rb_1 和野黄芩苷峰面积的 RSD 分别为 1.62%、1.25%、1.10%和 1.41%，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 20150116），按“2.1.1”项方法平行制备 6 份供试品溶液，进样测定，结果三七皂苷 R_1、人参皂苷 Rg_1、人参皂苷 Rb_1 和野黄芩苷质量分数的 RSD 分别为 1.71%、1.86%、0.97%

和 1.63%。

2.8 加样回收率试验

取已测定的保肝丸（批号 20150116）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（三七皂苷 R_1 质量浓度分别为 17.708、35.417、70.834 mg/L；人参皂苷 Rg_1 质量浓度分别为 24.219、48.438、96.875 mg/L；人参皂苷 Rb_1 质量浓度分别为 6.150、13.021、26.042 mg/L；野黄芩苷质量浓度分别为 11.438、22.917、45.833 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。结果三七皂苷 R_1、人参皂苷 Rg_1、人参皂苷 Rb_1、野黄芩苷的平均回收率分别为 101.76%、99.66%、99.43%、101.26%，RSD 分别为 1.81%、1.79%、1.39%、1.51%。

2.9 样品测定

取 5 批保肝丸样品，按“2.1.1”项方法处理 6，按“2.2”项色谱条件进行测定，结果见表 1。结果保肝丸每一药丸（约 0.556 mg）含三七皂苷 R_1 的平均量为 4.303 μg；含人参皂苷 Rg_1 的平均量为 31.729 μg；含人参皂苷 Rb_1 的平均量为 20.776 μg；含野黄芩苷的平均量为 1.071 μg。

表 1 样品测定结果

Table 1 Determination results of samples

批号	含量/(μg·丸$^{-1}$)			
	三七皂苷 R_1	人参皂苷 Rg_1	人参皂苷 Rb_1	野黄芩苷
20141205	4.312	31.719	20.769	1.071
20141219	4.299	31.740	20.770	1.057
20141226	4.309	31.729	20.782	1.061
20150109	4.291	31.739	20.790	1.079
20150116	4.306	31.719	20.771	1.086

3 讨论

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。可见，探讨、发现、研制对伴有基础肝病肝脏的保护与再生作用的药物是非常重要和有意义的[5]。

三七皂苷 R_1、人参皂苷 Rg_1、人参皂苷 Rb_1 和野黄芩苷是保肝丸的主要活性成分，准确测定其量是保证制剂质量的关键所在。本研究通过对三七皂苷 R_1、人参皂苷 Rg_1、人参皂苷 Rb_1 和野黄芩苷进行紫外可变波长扫描，发现在 203 nm 它们均有较大的吸收，因而，将 203 nm 作为三七皂苷 R_1、人参皂苷 Rg_1、人参皂苷 Rb_1 和野黄芩苷的检测波长。

野黄芩苷本身显弱酸性，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 3 种成分三七皂苷 R_1、人参皂苷 Rg_1、人参皂苷 Rb_1 在此洗脱条件下也得到很好的分离。

野黄芩苷是黄芩中的单体成分，属于黄酮类化合物。一般 HPLC 测定的文献都将检测波长定为 275 nm[6]或 335 nm[7]。但经过紫外扫描及实验验证，野黄芩苷在 203 nm 的吸收大于 275 nm 或 335 nm。因而，本实验测定野黄芩苷的波长选定在 203 nm。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，实验数据准确可靠。本研究运用 RP-HPLC 法采用梯度洗脱、恒定波长，同时检测三七皂苷 R_1、人参皂苷 Rg_1、人参皂苷 Rb_1 和野黄芩苷的量，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，而且也为其他以此 4 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] 贾继东, 魏 来, 庄 辉. 中国肝脏病学现状及发展方向 [J]. 中国病毒病杂志, 2011, 1(1): 1-3.

[2] 崔翰明, 张秋燕, 林 海, 等. 三七总皂苷的大孔吸附树脂纯化工艺和质量分析研究 [J]. 中草药, 2012, 43(11): 2177-2182.

[3] 吴清和. 中药药理学 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2008.

[4] 肖灵芝. 中药黄芩的药理和应用 [J]. 中医临床研究, 2014, 6(3): 133-134.

[5] 韩根利, 刘宏胜, 张雅敏. RP-HPLC 同时测定保肝丸中马钱素、芍药苷和黄芩素 [J]. 中草药, 2015, 45(20): 3312-3316.

[6] 赵 亮, 王新霞, 吕 磊, 等. HPLC 法测定清肝散结颗粒中黄芩苷、汉黄芩苷、野黄芩苷、黄芩素及汉黄芩素 [J]. 中成药, 2014, 36(2): 313-319.

[7] 黄晓燕, 丁 野, 郑金凤, 等. 灯盏花素滴丸的溶出度研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(16): 82-84.