

[质 量]

清胆胶囊中 5 个主要成分的定量测定

石志娜, 周 昕*, 梁晓强, 谢瑞芳, 张静喆*
(上海中医药大学附属龙华医院, 上海 200032)

摘要: 目的 建立清胆胶囊(大黄、虎杖、陈皮等)中 5 个主要成分的定量测定方法。方法 以虎杖苷、橙皮苷、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚为考察指标, 采用 1100 系列安捷伦色谱仪和 XDB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm)及 C₁₈ 保护柱; 柱温为 25℃; 以甲醇-0.1% 磷酸水为流动相梯度洗脱, 体积流量为 1.0 mL/min; 检测波长 280 nm; 检测时间 142 min。结果 在该色谱条件下, 包括上述 5 个指标成分在内的 22 个峰得到了良好的基线分离。结论 该方法稳定性、准确度和回收率良好。该 HPLC 方法可用于清胆胶囊的质量控制。

关键词: 清胆胶囊; 虎杖苷; 橙皮苷; 大黄素; 大黄酚; 大黄素甲醚

中图分类号: R927.2

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2011)10-1722-05

The content determination of five main ingredients in Qingdan Capsule

SHI Zhi-na, ZHOU Xin*, LIANG Xiao-qiang, XIE Rui-fang, ZHANG Jing-zhe*

(Longhua Hospital Affiliated to Shanghai University of TCM, Shanghai 200032, China)

ABSTRACT: **AIM** To establish the analytical method of quality control for the five effective ingredients in Qingdan Capsule (*Rhei Radix et Rhizoma*, *Polygoni cuspidati Rhizoma et Radix*, *Citri Reticulatae pericarpium*, etc.).

METHODS Polydatin, hesperidin, emodin, chrysophanol, physcion were adopted as the reference substances, HPLC method was established using agilent 1100 HPLC system. A XDB-C₁₈ column (4.6 mm×250 mm, 5 μm) coupled with a C₁₈ guard column was used at 25℃. A mobile phase consisted of methanol and 0.1% H₃PO₄ water was used for gradient elution at a flow rate of 1.0 mL/min. Detection wavelength was set at 280 nm, detection time was 142 minutes. **RESULTS** Under this developed condition, twenty-two peaks were obtained, including above five reference chemical components. **CONCLUSION** The stability, accuracy and recovery of this method are good. This HPLC fingerprint chromatogram can be used for the quality control of Qingdan Capsule.

KEY WORDS: Qingdan Capsule; polydatin; hesperidin; emodin; chrysophanol; physcion

清胆胶囊是我院研发的中药新药, 由我院朱培庭教授根据多年临床经验总结而来。主要由大黄、虎杖、陈皮等组成, 具有清除湿热、行气活血、缓下通便和健脾和中之功效^[1], 主要用于治疗气郁型慢性胆囊炎、胆结石、慢性胆管炎、胆管结石等症且有一定的预防作用, 有确定的临床疗效^[2-4]。方中大黄清泄湿热、利胆消黄, 为君药; 虎杖清热解毒、利湿活血, 兼缓下通便, 为臣药; 陈皮行气, 与大黄、虎杖活

血作用相配, 可奏行气活血之功效, 以达通则不痛的目的, 为使药^[1, 5-6]。现代药理学研究表明: 清胆胶囊在肝胆水平有显著的药理效应^[7], 如显著降低成石率, 改善与成石相关的血清及肝脏等生化学异常^[8-9]; 明显降低肝脏、胆汁中 β-葡萄糖醛酸酶活力^[8, 10], 降低胆汁中游离胆红素和钙离子含量, 逆转成石胆汁, 发挥防治胆色素结石的作用^[1, 10]; 还可通过上调肝脏组织中胆石相关基因 B-UGTmRNA 和

收稿日期: 2011-04-25

基金项目: 上海市医学领军人才资助课题(L106048); 上海市科委自然科学基金项目(11ZR1436800); 国家教育部高等学校博士点基金(200802680005)

作者简介: 石志娜(1987—), 女, 硕士生。

* 通信作者: 张静喆(1955—), 男, 主任医师, 教授, 主要从事中医药防治肝胆胰疾病的临床与基础研究。Tel: (021) 64385700×3815, E-mail: zjzzq@sina.com; 周 昕(1974—), 女, 博士, 副主任药师, 主要从事医院药学研究。Tel: (021) 64385700×7106, E-mail: zhouxinren@yahoo.com.cn

(YPTA) mRNA 的表达,干预胆红素和胆固醇代谢,抑制致石性胆汁的形成,从而达到预防胆结石的目的^[8,11];等等。

众所周知,中药质量控制方法对中药的疗效至关重要。选取药物中的主要有效成分进行定量测定,可以间接的考察中药的质量。因此,本实验收集 3 批清胆胶囊,建立清胆胶囊中有效成分的定量测定方法,以对清胆胶囊的质量进行有效的控制。

1 实验仪器及试剂

1.1 仪器 Agilent 1100 型高效液相色谱仪(德国 Agilent 公司),由 G1311A 色谱泵,G1379A 在线脱气装置,G1313A 自动进样器,G1316A 柱温箱及 G1315B 两极管阵列检测仪组成;XW-80A 旋涡混合器(上海医科大学仪器厂);SB2200 超声仪(上海必能超声仪器公司);AL204 电子天平(梅特勒-托利多仪器上海有限公司)等仪器。

1.2 试剂 虎杖苷(批号 111575-200502)、橙皮苷(批号 110721-200613)、大黄素(批号 110756-200110)、大黄酚(批号 110796-201017)、大黄素甲醚(批号 110758-200912)等对照品购自中国药品生物制品检定所(纯度 > 99%)。HPLC 级甲醇购自 Merck 公司(德国),水为纯化水,由 Milli-Q 水处理系统处理(Millipore, Bedford, MA, USA),其他试剂为分析纯,购自上海吴泾化工厂。

清胆胶囊(080401、090501、100101 等 3 个批号)均为上海上联药业有限公司生产。

2 实验方法

2.1 实验条件

2.1.1 色谱条件 色谱柱: ZORBAX XDB-C₁₈ 990967-902(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),以甲醇为流动相 A,0.1% 磷酸水为流动相 B,进行梯度洗脱,洗脱条件见图 1 所示,体积流量为 1 mL/min,检测波长为 280 nm,柱温为 25 °C,进样量为 5 μL。

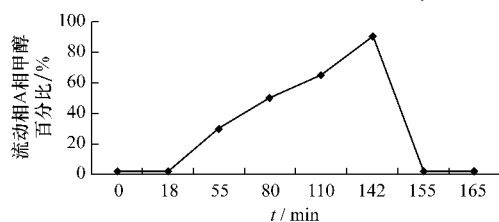


图 1 梯度洗脱中流动相变化图

Fig. 1 Mobile phase variations in gradient elution

2.1.2 对照品溶液配制 精密称取虎杖苷 1.40 mg、橙皮苷 2.10 mg、大黄素 1.08 mg、大黄酚 0.75 mg 及大黄素甲醚 1.17 mg,于 10 mL 量瓶中,用甲醇

定容,然后稀释至不同浓度,0.22 μm 微孔滤膜滤过,作为对照品溶液。

2.1.3 供试品溶液配制 精密称取清胆胶囊约 0.5 g 于 10 mL 量瓶中,加甲醇约至刻度线,超声提取 20 min,冷却至室温,补充溶剂至刻度,摇匀,静置过夜后,取上清液,10 000 r/min,离心 10 min,经 0.22 μm 微孔滤膜滤过,作为供试品溶液。

2.2 方法学考察

2.2.1 标准曲线 精密吸取虎杖苷、橙皮苷、大黄素、大黄酚及大黄素甲醚不同浓度的对照品溶液注入色谱仪,进样量为 5 μL,按 2.1.1 项下色谱条件测定峰面积,制定标准曲线,结果见表 1。

表 1 虎杖苷、橙皮苷、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚标准曲线
Tab. 1 The standard curves of polydatin, hesperidin, emodin, chrysophanol and physcion

对照品	回归方程	线性范围 (μg/mL)	相关系数 (r)
虎杖苷	$Y = 618X - 3.0842$	28 ~ 420	0.9998
橙皮苷	$Y = 1650.4X - 0.936$	42 ~ 630	0.9999
大黄素	$Y = 2883.9X + 3.6094$	0.83 ~ 280.8	0.9999
大黄酚	$Y = 2135.3X + 12.149$	0.576 ~ 195	0.9999
大黄素甲醚	$Y = 760.78X - 0.2042$	0.576 ~ 195	0.9998

2.2.2 精密度试验 分别取虎杖苷(140 μg/mL)、橙皮苷(213 μg/mL)、大黄素(108 μg/mL)、大黄酚(75 μg/mL)、大黄素甲醚(117 μg/mL)对照品溶液 5 μL,重复进样 6 次,按色谱条件测定峰面积,结果见表 2。

表 2 虎杖苷、橙皮苷、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚的精密试验 (n=6)

Tab. 2 The precision tests of polydatin, hesperidin, emodin, chrysophanol and physcion (n=6)

化合物	峰面积值	RSD / %
虎杖苷(140 μg/mL)	432.6 ± 7.8	1.80
橙皮苷(213 μg/mL)	1748.4 ± 42.0	2.40
大黄素(108 μg/mL)	1561.8 ± 25.5	1.63
大黄酚(75 μg/mL)	818.0 ± 10.3	1.26
大黄素甲醚(117 μg/mL)	450.3 ± 6.6	1.47

2.2.3 稳定性试验 取同一份清胆胶囊按 2.1.3 项下处理得供试品溶液,在 0、3、6、24、48 h 分别进样 5 μL,记录峰面积,主要指标成分的 RSD 结果见表 3。

2.2.4 加样回收率试验 取同一份清胆胶囊,按高、中、低剂量分别加入虎杖苷、橙皮苷、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚等对照品,按 2.1.3 项下处理得供试品溶液,记录峰面积,计算回收率,结果见表 4。

表 3

清胆胶囊稳定性试验

Tab. 3

The stability tests of Qingdan Capsule

时间	虎杖苷		橙皮苷		大黄素		大黄酚		大黄素甲醚	
	tR8/min	A8 峰面积值	tR10/min	A10 峰面积值	tR19/min	A19 峰面积值	tR21/min	A21 峰面积值	tR22/min	A22 峰面积值
0 h	62.36	266	72.73	2 099	127.4	3 009	131.5	448	138.1	817
3 h	62.29	271	72.64	2 166	127.5	3 110	131.5	410	138.1	836
6 h	62.21	269	72.60	2 109	127.7	3 028	131.7	401	138.1	820
24 h	62.25	273	72.59	2 162	127.5	3 118	131.5	414	138.0	849
48 h	62.39	267	72.70	2 123	127.9	3 046	131.8	409	138.3	828
平均值	62.30	269	72.65	2 132	127.6	3 062	131.6	416	138.1	830
SD	0.08	3	0.06	31	0.19	49	0.14	18	0.09	13
RSD/%	0.12	1.02	0.08	1.44	0.15	1.60	0.10	4.40	0.07	1.57

表 4

加样回收率试验

Tab. 4

The recovery experiments

成分	加入对照品量/mg	测得对照品量/mg	回收率/%	平均加样回收率/%	SD	RSD/%
虎杖苷	80%	0.417 2	0.424 4	101.73	98.92	2.45
		0.417 2	0.407 8	97.74		
		0.417 2	0.405 8	97.28		
		0.521 5	0.509 5	97.70		
	100%	0.521 5	0.511 3	98.05	99.38	2.61
		0.521 5	0.534 0	102.39		
		0.625 8	0.641 7	102.54		
		0.625 8	0.624 0	99.71		
	120%	0.625 8	0.615 9	98.41	100.22	2.11
		0.659 0	0.688 4	104.46		
		0.659 0	0.703 7	106.78		
		0.659 0	0.676 1	102.58		
橙皮苷	80%	0.823 8	0.796 9	96.74	97.64	5.17
		0.823 8	0.766 0	92.98		
		0.823 8	0.850 1	103.20		
		0.988 6	1.062 9	107.52		
	120%	0.988 6	1.037 5	104.95	106.43	1.33
		0.988 6	1.056 1	106.83		
		0.497 6	0.536 6	107.84		
		0.497 6	0.541 8	108.87		
	80%	0.497 6	0.525 4	105.58	107.43	1.68
		0.622 0	0.608 6	97.85		
		0.622 0	0.615 6	98.96		
		0.622 0	0.590 7	94.97		
大黄素	100%	0.746 4	0.754 6	101.09	97.26	2.06
		0.746 4	0.797 5	106.85		
		0.746 4	0.786 5	105.37		
		0.139 3	0.123 8	88.92		
	80%	0.139 3	0.122 2	87.72	90.41	3.67
		0.139 3	0.131 8	94.60		
		0.174 1	0.165 2	94.91		
		0.174 1	0.161 0	92.50		
	100%	0.174 1	0.159 2	91.47	92.96	1.77
		0.208 9	0.201 3	96.34		
		0.208 9	0.200 2	95.82		
		0.208 9	0.206 7	98.93		

续表 4

成分	加入对照品量/mg	测得对照品量/mg	回收率/%	平均加样回收率/%	SD	RSD/%
大黄素甲醚	0.382 9	0.388 0	101.35	105.11	3.54	3.37
	80% 0.382 9	0.404 3	105.60			
	0.382 9	0.415 0	108.39			
	0.478 6	0.492 9	102.99	108.18	4.58	4.23
	100% 0.478 6	0.526 2	109.94			
	0.478 6	0.534 2	111.62			
	0.574 3	0.560 2	97.54	106.26	7.55	7.11
	120% 0.574 3	0.634 4	110.47			
	0.574 3	0.636 2	110.77			

2.2.5 重复性试验 取同一批次清胆胶囊,按 2.1.3 项下平行处理 5 份供试品溶液,分别进样 5 μL ,记录峰面积,主要指标成分的量(以 $\bar{x} \pm s$ 形式表示)和 RSD 结果见表 5。

表 5 重复性试验

Tab. 5 The reproducibility experiments

编号	虎杖苷/(mg/g)	橙皮苷/(mg/g)	大黄素/(mg/g)	大黄酚/(mg/g)	大黄素甲醚/(mg/g)
1	1.691	5.802	4.157	0.732	4.521
2	1.761	5.853	4.380	0.772	4.508
3	1.620	4.764	3.747	0.775	4.704
4	1.665	5.007	4.035	0.684	4.646
5	1.700	5.014	4.128	0.713	4.687
$\bar{x} \pm s$	1.680 ± 0.052	5.288 ± 0.503	4.089 ± 0.230	0.753 ± 0.039	4.613 ± 0.093
RSD/%	3.06	9.51	5.61	5.33	2.01

表 6 3 批次清胆胶囊主要指标成分的量

Tab. 6 The main index concentrations in Qingdan Capsule of three batches

编号	虎杖苷/(mg/g)	RSD/%	橙皮苷/(mg/g)	RSD/%	大黄素/(mg/g)	RSD/%	大黄酚/(mg/g)	RSD/%	大黄素甲醚/(mg/g)	RSD/%
080401	1.043 ± 0.027	2.57	8.238 ± 0.474	5.75	12.441 ± 1.242	9.98	1.706 ± 0.149	8.75	9.572 ± 0.665	6.94
100101	1.090 ± 0.032	2.97	10.267 ± 0.354	3.45	3.103 ± 0.072	2.32	0.531 ± 0.013	2.36	4.102 ± 0.138	3.37
090501	2.801 ± 0.081	2.89	11.099 ± 0.122	1.10	4.988 ± 0.049	0.97	0.748 ± 0.039	5.27	5.181 ± 0.049	0.95
平均值	1.644 ± 1.002		9.868 ± 1.471		6.844 ± 4.938		0.995 ± 0.625		6.285 ± 2.897	

2.3 样品测定 精密称取 3 个批号清胆胶囊,每个批次平行 3 份,按 2.1.3 项下处理得供试品溶液,注入高效液相色谱仪,进样量为 5 μL ,按 2.1.1 项色谱条件进行测定,记录色谱图(见图 2)。同时将不加入药材的辅料按 2.1.3 项下处理得阴性样品溶

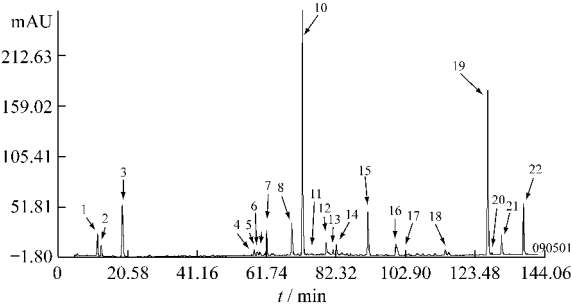


图 2 清胆胶囊样品 HPLC 图谱

Fig. 2 The HPLC chromatogram of Qingdan Capsule

8. 虎杖苷 10. 橙皮苷 19. 大黄素 21. 大黄酚 22. 大黄素甲醚
8. polydatin 10. hesperidin 19. emodin 21. chrysophanol 22. physcion

液,注入高效液相色谱仪,进样量为 5 μL ,按 2.1.1 项色谱条件进行测定,记录色谱图(见图 3)。

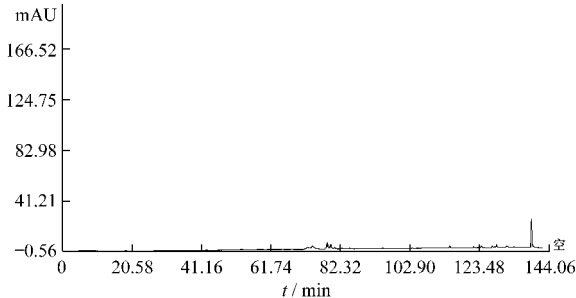


图 3 清胆胶囊阴性样品 HPLC 图谱

Fig. 3 The HPLC chromatogram of negative sample of Qingdan Capsule

2.4 统计分析 虎杖苷、橙皮苷、大黄素、大黄酚及大黄素甲醚等各指标成分以峰面积为纵坐标,以对照品量(μg)为横坐标,采用回归分析,得到标准曲线。

各批清胆胶囊的保留时间和峰面积以平均值 $\bar{x} \pm s$ 表示,相对标准偏差(RSD)为标准偏差(SD)于平均值之比,供试品中各指标成分根据回归方程,计算含量(见表6)。

3 结果和讨论

3.1 色谱条件的优化 本次研究在 HPLC 测定方法摸索过程中,主要通过对流动相比比例的改变(梯度洗脱)来使色谱峰分离,试验曾选用甲醇-0.1%磷酸水(80:20)^[12-13],甲醇-0.1%磷酸水(70:30)等甲醇与 0.1%磷酸水不同比例的流动相,经过与图谱的比较,在多次调整甲醇与 0.1%磷酸水的比例及比例变化时间点后,最终确定现有色谱条件下,色谱峰能达到基线分离。

在此条件下,共得到 22 个色谱峰,其中包括虎杖苷、橙皮苷、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚 5 个成分,保留时间分别为 62.30 min,72.65 min,127.62 min,131.62 min,138.12 min,其回归方程的相关系数大于 0.999 8,表明各化合物在相应的范围内具有良好的线性关系(见表1)。

由于清胆胶囊由大黄、虎杖和陈皮组成,大黄素、大黄酚、大黄素甲醚为大黄的主要成分,虎杖苷及橙皮苷为虎杖和陈皮的主要成分,均为有效成分,具有一定代表性,因此选用这 5 个成分作为清胆胶囊的指标成分。

3.2 方法学结果表明 这 5 个指标成分虎杖苷、橙皮苷、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚峰面积的 RSD 分别为 1.80%、2.40%、1.63%、1.26% 和 1.47%,表明仪器精密度良好(见表2);同一供试品在 48h 内,各指标成分峰面积保留时间的 RSD 小于 2%,峰面积的 RSD 小于 5%,表明该色谱条件在 48 h 内稳定性良好(见表3);虎杖苷、橙皮苷、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚的回收率分别为 98.92%~100.22%,97.64%~106.43%,97.26%~107.43%,90.41%~97.03%,105.11%~108.18%,表明回收率良好(见表4);5 份平行处理的供试品各指标成分的 RSD 小于 10%,说明重复性较好(见表5);3 个批次

清胆胶囊主要指标成分质量分数的 RSD 在 0.95%~9.98%,但是各批次主要指标成分量还是有一定差异,说明中药工艺稳定性还有待于提高(见表6)。

4 结论

本实验采用 HPLC 法对清胆胶囊进行测定,建立了定量测定方法,可以在同一条件下,使 20 余个峰得到良好的基线分离,同时测定虎杖苷、橙皮苷、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚等 5 个指标成分的量。进一步方法学研究表明,该色谱方法可靠、稳定、重现性良好,可以考虑作为清胆胶囊的质量控制方法。

参考文献:

- [1] 张静喆,章学林,梁晓强,等.不同中药对豚鼠胆色素结石模型的生化影响[J].中西医结合学报,2008(6):856-859.
- [2] 朱培庭,张静喆,曹中平,等.治疗慢性胆道感染、胆石病 274 例的总结[J].上海中医药杂志,1986,20(9):15-17.
- [3] 宋华荣,朱培庭,张静喆,等.胆石净治疗慢性胆道感染、胆石病的疗效观察[J].上海中医药杂志,2002(8):13-14.
- [4] 朱培庭,朱世敏.实用中医胆病[M].北京:人民卫生出版社,1999:215-217.
- [5] 梁晓强,顾宏刚,章学林,等.清胆胶囊对豚鼠胆色素结石模型的生化影响[J].辽宁中医杂志,2008,35(10):1607-1608.
- [6] 叶显纯.中草药[M].上海:上海中医药大学出版社,1998.
- [7] 侯家玉.中药药理学[M].北京:中国中医药出版社,2002:120-231.
- [8] 朱培庭,张静喆,高 炬,等.“胆病从肝论治”理论与应用研究[J].中国医学学报,2004(19):58-60.
- [9] 张静喆,梁晓强,顾宏刚,等.不同治则中药对胆囊胆固醇结石小鼠模型的成石影响[J].中国中西医结合外科杂志,2009,15(3):291-294.
- [10] 宋华荣,朱培庭,张静喆,等.胆石净溶石作用的实验研究[J].上海中医药大学学报,2002,16(2):41-44.
- [11] 朱培庭,张静喆,章学林,等.升清胶囊对豚鼠胆石病相关基因的影响[J].中西医结合学报,2005,3(3):207-210.
- [12] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:2010 年版一部[S].北京:中国医药科技出版社,2010:194-195.
- [13] 韩俊伟,京秋芳,杨 蓉. HPLC 法测定结核丸中大黄素、大黄酚的质量[J].山西中医,2009,25(11):46-48.