

胆南星质量评价方法初探

赵启苗¹, 单国顺², 陈江宁², 高慧², 贾天柱^{2*}

(1. 辽宁中医药大学杏林学院, 沈阳 110167; 2. 辽宁中医药大学药学院, 辽宁大连 116600)

[摘要] **目的:**建立胆南星中总胆酸、猪去氧胆酸及鹅去氧胆酸的含量测定方法,为该药物的质量评价提供检测手段。**方法:**采用紫外分光光度法,以鹅去氧胆酸为指标成分,建立胆南星中总胆酸的含量测定方法,检测波长 379 nm。采用高效液相色谱-电雾式检测器法(HPLC-CAD),建立胆南星中猪去氧胆酸和鹅去氧胆酸的含量测定方法,流动相 0.1% 冰乙酸(A)-乙腈(B)梯度洗脱(0~20 min, 40%~45% B; 20~45 min, 45%~55% B),流速 0.8 mL·min⁻¹,柱温 30℃。**结果:**鹅去氧胆酸在 0~2.435 g·L⁻¹与吸光度呈良好线性关系,平均加样回收率 98.98%,RSD 1.0%。猪去氧胆酸和鹅去氧胆酸分别在 4.7~94, 5.44~108.8 mg·L⁻¹与峰面积呈良好线性关系,平均加样回收率依次为 99.53% (RSD 1.0%) 和 99.58% (RSD 1.4%)。**结论:**建立的含量测定方法操作简便、准确度高、重复性好,适用于胆南星的质量评价。

[关键词] 胆南星; 紫外分光光度法; 总胆酸; 猪去氧胆酸; 鹅去氧胆酸; 方法学考察

[中图分类号] R284.1; R282.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)06-0028-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.2017060028

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20161228.1112.012.html>

[网络出版时间] 2016-12-28 11:12

Preliminary Study on Quality Evaluation of Arisaema Cum Bile

ZHAO Qi-miao¹, SHAN Guo-shun², CHEN Jiang-ning², GAO Hui², JIA Tian-zhu^{2*}

(1. College of Xinglin, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Shenyang 110167, China;

2. College of Pharmacy, Liaoning University of TCM, Dalian 116600, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a determination method of total cholic acid, hyodeoxycholic acid and chenodeoxycholic acid in Arisaema Cum Bile, which could provide an valuable mean to control its quality. **Method:** The analysis was performed on ultraviolet spectrophotometry to determine the content of total cholic acid in Arisaema Cum Bile with chenodeoxycholic acid as marker substance. HPLC-CAD was used to analyze determination of hyodeoxycholic acid and chenodeoxycholic acid in Arisaema Cum Bile. **Result:** In the range of 0-2.435 g·L⁻¹, it showed good linear relationships between the concentration of chenodeoxycholic acid and absorbance. The average recovery was 98.98% with RSD of 1.0%. Hyodeoxycholic acid and chenodeoxycholic acid were linear with the peak area in the range of 4.7-94, 5.44-108.8 mg·L⁻¹, the average recovery was 99.53% and 99.58%, respectively. **Conclusion:** This method is simple, accurate and suitable for the quality evaluation of Arisaema Cum Bile.

[Key words] Arisaema Cum Bile; ultraviolet spectrophotometry; total cholic acid; hyodeoxycholic acid; chenodeoxycholic acid; methodological review

胆南星是由制天南星细粉与牛、羊或猪胆汁经 加工炮制而成,或由天南星细粉与牛、羊或者猪胆汁

[收稿日期] 20160909(015)

[基金项目] 国家中医药管理局行业专项(201507009-03)

[第一作者] 赵启苗,在读博士,讲师,从事中药炮制原理及质量标准研究, Tel:0411-85890151, E-mail: zhaqiqimiao1983@163.com

[通讯作者] *贾天柱,教授,从事中药炮制化学与化学炮制学研究, Tel:0411-85890135, E-mail: jiatzh@126.com

经发酵加工而成^[1]。天南星生品辛温燥烈,有毒,多外用。加工成胆南星后,燥烈之性得到了缓和,毒性也降低了,同时药性也发生了改变,性由温转凉,味由辛转苦,从而变温化寒痰药为清化热痰、息风定惊之品^[2]。传统中医学认为,胆南星具有很好的治疗惊风的作用。但是,由于胆南星的药效物质基础并不明确,相应的质量标准研究也受到了限制。目前,有关胆南星的质量研究主要集中在对胆南星中胆尿酸类成分的分析,在方法上也主要以薄层色谱法、紫外吸收法等相对简单的方法为主。

胆汁作为胆南星炮制过程中的辅料,其本身具有镇静、安神、镇咳及抗炎等作用^[3],这与胆南星的功效相符,推测可通过分析胆汁中活性成分的含量来进行胆南星的质量评价。胆汁中的胆尿酸类成分是其活性部位,其中以胆酸、猪去氧胆酸、鹅去氧胆酸等为主要活性成分。因此,本实验尝试通过建立胆南星中总胆酸、猪去氧胆酸及鹅去氧胆酸的含量测定方法,为胆南星的质量评价提供可行方法。

1 材料

LC-20AB 型高效液相色谱仪(日本岛津公司),Corona™型电雾式检测器(美国赛默飞公司),T-6 型新世纪紫外-可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司),XP6 型电子分析天平(瑞士梅特勒-托利多公司),FA1004B 型电子天平(上海精密科学仪器有限公司)。

15 批胆南星药材饮片均经辽宁中医药大学中药鉴定教研室翟延君教授鉴定为生天南星细粉与牛、羊或猪胆汁经发酵制成。猪去氧胆酸对照品(中国食品药品检定研究院,批号 100087-201411,经 HPLC 测定纯度 >98%),鹅去氧胆酸对照品(上海源叶生物科技有限公司,批号 Z25M3L11,经 HPLC 测定纯度 >98%),水为超纯水,乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 总胆酸的含量测定

2.1.1 对照品溶液的制备 精密称取鹅去氧胆酸对照品约 250 mg,于 250 mL 量瓶中,加冰乙酸定容至刻度,得 $0.974 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 鹅去氧胆酸对照品溶液。

2.1.2 供试品溶液的制备^[3] 取过 5 号筛的胆南星样品粉末约 1.0 g,精密称定,置锥形瓶中,加乙酸乙酯 100 mL,水浴回流 1.5 h,于提取结束时加入活性炭 0.5 g,继续回流 0.5 h,放凉,滤过,滤液水浴蒸干,用 60% 冰乙酸溶解并定容于 50 mL 量瓶中,摇匀,即得。

2.1.3 检测波长的确定 精密吸取上述对照品及供试品溶液各 1.0 mL,置于 25 mL 带刻度试管中,分别加入 50% 硫酸溶液 14 mL,混匀,75 °C 水浴反应 10 min,冰水浴中放置 2 min,以 60% 冰乙酸为空白,于 200 ~ 400 nm 扫描,结果对照品溶液和供试品溶液均在 379 nm 处有最大吸收波长,故选择检测波长 379 nm。

2.1.4 标准曲线的制备 精密吸取 $0.974 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 鹅去氧胆酸对照品溶液 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0, 5.0 mL,分别置于 25 mL 带刻度的试管中,水浴蒸干,分别加入 60% 冰乙酸 1.0 mL 使溶解,按 2.1.3 项下方法操作,于 379 nm 处测定吸光度 A ,以质量浓度为横坐标, A 为纵坐标,得回归方程 $Y = 0.356X - 0.155 (r = 0.9990)$,线性范围 $0 \sim 2.435 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.1.5 精密度试验 分别精密量取对照品溶液 1.0 mL,置于 25 mL 带刻度试管中,按 2.1.3 项下方法操作,于 379 nm 处连续测定 6 次,结果 A 的 RSD 0.9%,表明仪器精密度良好。

2.1.6 重复性试验 精密称取同一胆南星样品粉末 6 份(四川广汉中药饮片有限公司,批号 150318),按 2.1.2 项下方法制备供试品溶液,按 2.1.3 项下方法操作,于 379 nm 处测定 A ,计算总胆酸质量分数 $44.55 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$,RSD 1.4%,表明该方法的重复性良好。

2.1.7 稳定性试验 精密称取胆南星样品(四川广汉中药饮片有限公司,批号 150318)约 1.0 g,按 2.1.2 项下方法制备供试品溶液,取同一供试品溶液,分别于室温下放置 0, 0.25, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 h 后按 2.1.3 项下方法操作,于 379 nm 处测定 A ,计算 RSD 2.9%,表明供试品溶液在 2.0 h 内稳定。

2.1.8 加样回收率试验 精密称取同一胆南星样品粉末 6 份(四川广汉中药饮片有限公司,批号 150318),精密称定,分别加入鹅去氧胆酸对照品溶液 1 mL,按 2.1.2 项下方法制备供试品溶液,按 2.1.3 项下方法操作,于 379 nm 处测定 A ,结果平均回收率 98.98%,RSD 1.0%,见表 1。

2.2 猪去氧胆酸及鹅去氧胆酸的含量测定

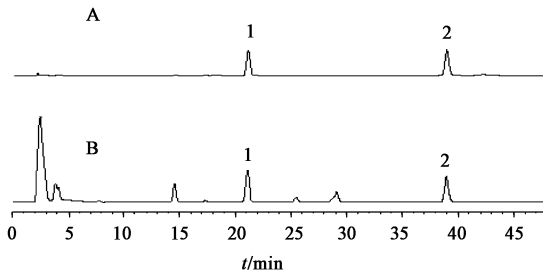
2.2.1 色谱条件 Symmetry C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),柱温 30 °C,流动相 0.1% 冰乙酸(A)-乙腈(B)梯度洗脱(0 ~ 20 min, 40% ~ 45% B; 20 ~ 45 min, 45% ~ 55% B),流速 $0.8 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$;电雾式检测器参数为雾化气压 241 kPa,滤噪模式高,阈值 200 pA。见图 1。

表 1 总胆酸含量测定的加样回收率试验

Table 1 Recovery test of determination of total cholic acid in *Arisaema Cum Bile*

称样量 /g	样品中量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
0.501 8	21.99	41.20	98.6		
0.500 4	21.93	41.35	99.7		
0.501 6	21.98	41.09	98.1	98.98	1.0
0.505 3	22.14	41.43	99.0		
0.500 8	21.95	41.54	100.6		
0.502 3	22.01	41.08	97.9		

注:鹅去氧胆酸对照品加入量均为 19.48 mg。



A. 对照品; B. 供试品; 1. 猪去氧胆酸; 2. 鹅去氧胆酸

图 1 胆南星 HPLC

Fig. 1 HPLC chromatograms of *Arisaema Cum Bile*

2.2.2 混合对照品储备液的制备 取猪去氧胆酸及鹅去氧胆酸对照品适量,精密称定,加甲醇溶解并定容于 50 mL 量瓶中,超声处理 15 min,混匀,制成质量浓度分别为 94.0, 108.8 mg·L⁻¹ 的混合对照品储备液。

2.2.3 供试品溶液制备 精密称取胆南星粉末约 1.0 g,置于 50 mL 量瓶中,加入甲醇 25 mL,超声(100 W, 50 kHz)处理 30 min,放冷,加甲醇稀释至刻度,摇匀,经 0.45 μm 微孔滤膜滤过,即得。

2.2.4 线性关系考察 精密吸取上述对照品储备液 0.5, 1.0, 2.0, 5.0, 10.0 mL,分别置于 10 mL 量瓶中,用甲醇定容至刻度,制成系列质量浓度的混合对照品溶液,按 2.2.1 项下条件进样 20 μL,以峰面积为纵坐标,质量浓度为横坐标,得猪去氧胆酸、鹅去氧胆酸回归方程分别为 $Y = 32\,943X + 78\,208$ ($r = 0.999\,0$), $Y = 38\,729X + 96\,127$ ($r = 0.999\,0$),线性范围分别为 4.7 ~ 94.0, 5.44 ~ 108.8 mg·L⁻¹。

2.2.5 精密度试验 精密吸取同一混合对照品溶液,按 2.2.1 项下色谱条件连续进样 6 次,计算猪去氧胆酸及鹅去氧胆酸峰面积的 RSD 分别为 0.6% 和 1.0%,表明仪器精密度良好。

2.2.6 重复性试验 精密称取同一胆南星样品 6

份(四川千方中药饮片有限公司,批号 20150402),每份约 1.0 g,按 2.2.3 项下方法制备供试品溶液,按 2.2.1 项下条件测定,计算猪去氧胆酸及鹅去氧胆酸的平均质量分数分别为 0.667, 1.190 mg·g⁻¹, RSD 分别为 1.7% 和 1.2%,表明该方法重复性良好。

2.2.7 稳定性试验 精密称取胆南星样品(四川千方中药饮片有限公司,批号 20150402)约 1.0 g,按 2.2.3 项下方法制备供试品溶液,于室温下放置 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 后按 2.2.1 项下色谱条件测定,计算猪去氧胆酸和鹅去氧胆酸峰面积的 RSD 分别为 1.2% 和 0.7%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.2.8 加样回收率试验 取已知指标成分含量的胆南星样品(猪去氧胆酸及鹅去氧胆酸的质量分数分别为 0.667 7, 1.178 8 mg·g⁻¹) 6 份(四川千方中药饮片有限公司,批号 20150402),每份约 0.5 g,精密称定,置于 50 mL 量瓶中,分别精密加入 2.2.2 项下混合对照品溶液 4 mL,按 2.2.3 项下方法制备供试品溶液,按 2.2.1 项下色谱条件测定,计算加样回收率,见表 2。

表 2 猪去氧胆酸及鹅去氧胆酸含量测定的加样回收率试验

Table 2 Recovery tests of determination of hyodeoxycholic acid and chenodeoxycholic acid in *Arisaema Cum Bile*

成分	称样量 /g	样品中量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
猪去氧胆酸	0.504 5	0.336 9	0.376 0	0.717 0	101.1	99.53	1.0
	0.500 5	0.334 2	0.376 0	0.709 1	99.7		
	0.500 9	0.334 5	0.376 0	0.711 2	100.2		
	0.501 2	0.334 7	0.376 0	0.708 0	99.3		
	0.502 3	0.335 4	0.376 0	0.705 4	98.4		
	0.503 7	0.336 3	0.376 0	0.706 7	98.5		
鹅去氧胆酸	0.504 5	0.594 7	0.435 2	1.019 0	97.5	99.58	1.4
	0.500 5	0.590 0	0.435 2	1.020 4	98.9		
	0.500 9	0.590 5	0.435 2	1.023 9	99.6		
	0.501 2	0.590 8	0.435 2	1.029 5	100.8		
	0.502 3	0.592 1	0.435 2	1.033 8	101.5		
	0.503 7	0.593 8	0.435 2	1.025 5	99.2		

2.3 样品测定 取 15 批市售胆南星样品,精密称定,分别按 2.1 和 2.2 项下方法测定总胆酸、猪去氧胆酸和鹅去氧胆酸的含量,结果见表 3。

表 3 市售胆南星中总胆酸、猪去氧胆酸和鹅去氧胆酸的含量测定
Table 3 Determination of total cholic acid, hyodeoxycholic acid and chenodeoxycholic acid in Arisaema Cum Bile from different places

No.	来源	总胆酸	猪去氧胆酸	鹅去氧胆酸
				mg·g ⁻¹
1	广州康美药业有限公司	25.63	1.129	1.592
2	广州采芝林药业有限公司	44.75	3.517	4.598
3	广州东方大药房(同和店)	3.22	0.545	0.478
4	广州宝芝林大药房(东川店)	127.20	3.420	4.409
5	四川千方中药饮片有限公司	20.34	0.762	1.312
6	四川辅正药业股份有限公司	16.51	0.125	0.188
7	内江良辉药业有限公司	25.12	-	-
8	四川大华药房(锦江店)	55.70	4.072	2.798
9	安国增荣胆南星厂	112.87	10.962	11.137
10	北京大恒倍生制药厂有限公司	28.08	0.019	0.045
11	北京冠城药业有限公司	18.17	-	-
12	广西玉林市江兴饮片有限公司中药饮片加工厂	26.27	0.009	0.016
13	四川宝芳堂中医馆	14.44	-	-
14	四川百胜药业有限公司	20.64	1.945	1.364
15	四川广汉中药饮片有限公司	44.88	6.045	4.753

3 讨论

市售胆南星样品中总胆酸、猪去氧胆酸和鹅去氧胆酸的含量分析结果显示,胆南星中胆汁酸类成分的含量差别较大。这一方面与不同厂家在胆南星饮片加工中所使用的辅料及炮制工艺有差异相关,同时,这也反映出目前胆南星饮片的质量情况令人堪忧,急需建立标准的加工工艺及科学的质量标准,以保证该饮片的质量及临床疗效。

因此,为了更好地对胆南星的质量进行控制,以保证其临床疗效。本实验以胆南星中总胆酸及单体成分猪去氧胆酸和鹅去氧胆酸为测定指标,建立了中药胆南星的质量控制方法。其中总胆酸的含量测定以鹅去氧胆酸为对照,主要是考虑到有文献报道^[4]牛、羊、猪胆汁中仅有鹅去氧胆酸为 3 种胆汁中共有的成分。此外,猪去氧胆酸作为猪胆汁中特有成分,而市售胆南星多以猪胆汁为原料。因此,笔者选取了猪去氧胆酸及鹅去氧胆酸作为 HPLC 法进行分析的指标。但是,由于胆汁中的胆酸类成分多以结合性胆汁酸类成分存在,上述指标的选择仍不能全面代表胆汁酸类成分的存在状态,需要进一步建立包含该类成分分析的先进方法,以保证对胆南星的质量进行全面控制^[5]。另外,鉴于胆南星本身是

由胆汁与天南星经发酵制成,对于胆南星中来源于天南星的有效成分的研究也亟需进行。

目前,关于胆汁酸类成分的分析,已报道有使用紫外分光光度法及高效液相色谱法等^[4,6]。但由于胆汁酸本身为固醇类化合物,紫外吸收较弱,对猪去氧胆酸和鹅去氧胆酸进行时,采用紫外检测器进行检测的灵敏度低。因此,现多采用蒸发光散射检测器进行分析^[6-7]。电雾式检测器(charged aerosol detector, CAD)作为一种通用型检测器^[8],对不同结构的化合物有统一的响应。有研究也表明将本方法与高效液相色谱-蒸发光散射检测器(HPLC-ELSD)法在分析不同胆粉中的胆酸类成分时, CAD 的灵敏度为 ELSD 的 3.0 倍,线性范围比 ELSD 高 2 个数量级,并且 CAD 的响应因子比 ELSD 更具有一致性^[9-10]。因此,本研究采用 HPLC-CAD 建立了胆南星中 2 种胆酸类成分的分析方法,结果表明该方法简便、准确、重复性好,是进行胆南星质量控制的有效方法。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:261.

[2] 贾天柱. 中药炮制学[M]. 2 版. 上海:上海科学技术出版社,2013:284-285.

[3] 游元元,万德光. 动物胆汁药用研究进展[J]. 贵阳中医学院学报,2008,29(4):58-61.

[4] 万军,翟羽佳,闫翠起,等. 紫外分光光度法测定胆南星中总胆酸的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(14):71-73.

[5] 张能荣. 关于牛羊胆汁质量问题的研究[J]. 中国生化药物杂志,1979(2):74-83.

[6] 陈悦,王静,陈剑锋,等. HPLC 同时测定猪胆汁水解产物中猪去氧胆酸、鹅去氧胆酸的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(19):61-63.

[7] 李志万,马强,袁永生,等. HPLC-ELSD 法对猪胆粉中猪去氧胆酸的含量测定研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2005,11(5):14-16.

[8] 刘立洋,刘肖. 一种新型的通用型检测器——电喷雾检测器[J]. 环境化学,2011,30(9):141-145.

[9] 王一博,王春雨,曲范娜,等. 高效液相色谱-电雾式检测器同时测定猪、牛、羊、熊胆粉中 5 种胆汁酸的含量[J]. 分析化学,2014,42(1):109-112.

[10] 李欣逸,解达帅,胥敏,等. 胆南星质量标准的现状与思考[J]. 中国实验方剂学杂志,2016,22(14):231-234.

[责任编辑 刘德文]