

胃肠安丸化学成分分析

张静泽, 高文远*, 马超一, 刘 振

天津大学 药物科学与技术学院, 天津 300072

摘要 目的: 分析胃肠安丸方中的泻下成分与止泻成分, 并对具有泻下作用的大黄蒽醌进行定量测定。**方法:** 利用 LC-MS 对胃肠安丸复方中的主要成分进行定性分析。色谱柱: Kromasil C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-0.5%醋酸溶液梯度洗脱; 体积流量 1.0 mL/min; 检测波长 254 nm。**结果:** 芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚总质量分数在 1.03 mg/g 以上, 平均回收率为 100.38%, 所得结果的 RSD 值均小于 2%。**结论:** LC-MS 分析确定了胃肠安丸中的 12 个成分, 其中既有止泻作用成分又有泻下作用成分, 对其中具有明显泻下作用的蒽醌类化合物进行定量检测, 方法简便、灵敏、准确, 为探讨胃肠安丸的作用物质基础提供数据支持。

关键词 胃肠安丸; LC-MS; 大黄蒽醌

中图分类号: R917 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2010) 02-0116-05

Analysis on chemical components in Weichang'an Pill

ZHANG Jing-ze, GAO Wen-yuan, MA Chao-yi, Liu Zhen

College of Pharmaceutical Science and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072, China

Abstract Objective: To analyze the main components and establish an HPLC method for determination of free anthraquinones content in Weichang'an Pill. **Methods:** The separation was performed on ODS column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) of Kromasil. The mobile phase was a mixture of methanol-0.5% acetic acid solution, gradient elution, the flow rate was 1.0 mL/min and the wavelength was at 254 nm. **Results:** Twelve components of Weichang'an Pill were identified, including antidiarrhea and purgative constituents, simultaneously the total content of aloe emodin, rhein, emodin, chrysophanol, and physcion was determined at 1.03 mg/g. The average recovery rate was 100.38%, RSD of the results are all less than 2%. **Conclusion:** The method is simple, accurate, sensitive, and can be used to provide the data for the quality control of Weichang'an Pill.

Key words Weichang'an Pill; LC-MS; free anthraquinones

胃肠安丸是由木香、沉香、枳壳(麸炒)、檀香、大黄、厚朴(姜制)、朱砂、麝香、巴豆霜、大枣(去核)、川芎等 11 味中药组成^[1]。其组方独特, 止泻不留邪, 具有通因通用的特点, 对于治疗各种感染性、非感染性腹泻以及功能性胃肠病所造成的恶心、呕吐、腹胀、腹痛、腹泻等症状效果显著, 也就是能够明显缓解现代医学中腹泻型肠易激综合症的各种症状, 能改善胃肠功能、还具有解痉、止泻等作用。组方中既用到了能够抑制胃肠运动的木香、厚朴, 也用到了具有泻下作用的大黄和巴豆, 而 2005 版《中国药典》中只是以厚朴中的厚朴酚及厚朴酚作为质量控制的指标, 对于此复方中的主要活性成分的分析并不是非常清晰。

大黄的蒽醌类成分对小肠运动有明显的促进作用,

其中结合蒽醌或是大黄游离蒽醌既可增加小鼠胃内容物、又可显著增加其小肠和结肠的内容物, 产生泻下作用; 也有研究报道大黄中的泻下成分蒽醌类和止泻成分鞣质类, 大剂量时 (1~5 g) 蒽醌类成分发挥主要作用而泻下, 小剂量 (0.05~0.3 g) 则以鞣质的止泻作用为主导; 还有文献报道大黄泻下, 但与巴豆配伍后泻下力反缓的说法。显然大黄的用量在该方止泻作用的发挥上起到了至关重要的作用, 大黄中主要活性成分为蒽醌类化合物, 其具有明显的泻下作用。本文采用 LC-MS 法对胃肠安丸中的主要活性成分进行了分析, 并采用 RP-HPLC 法对胃肠安丸中所含的大黄蒽醌进行定量测定, 一方面能够为保证胃肠安丸用药的安全有效提供重要的数据支持, 另一方面为深入探讨大黄作为佐使药

收稿日期: 2010-02-20

* 通讯作者 高文远, Tel: (022) 87401895, Email: pharmgao@tju.edu.cn

在方中发挥的作用奠定基础。

1 材料和方法

1.1 样品与试剂

胃肠安丸由天津中新药业集团股份有限公司乐仁堂制药厂生产。对照品：芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚、厚朴酚、和厚朴酚、木香炔内酯、去氢木香内酯、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、阿魏酸、藜本内酯（中国药品生物制品检定所提供）。

乙腈、甲醇为色谱纯、冰醋酸、氯仿为分析纯（天津康科德医药化工有限公司）。

1.2 仪器

Aglient 1100 LC2 MSD Series Trap 系统，包括双高压溶剂泵，在线真空脱气机，自动进样器，柱温箱，光二极管阵列检测器（DAD），ESI 接口的离子阱质谱检测器；微量分析天平（CP225D，Sartorius Co.）；Kromasil C₁₈ 色谱柱（250 mm×4.6 mm，5 μm）；微量进样器（25 μL，Hamilton）。

高效液相色谱系统（Waters2414 型高效液相色谱仪；Waters2998 紫外-可见检测器）；微量分析天平（CP225D，Sartorius Co.）；Kromasil C₁₈ 色谱柱（250 mm×4.6mm，5 μm）；微量进样器（25 μL，Hamilton）。

1.3 色谱条件

LC-MS 色谱条件：流动相（A）：乙腈（B）：1%醋酸水溶液，梯度洗脱条件见表1；柱温 35℃；体积流量 1 mL/min；检测波长 254 nm。

表1 梯度洗脱表
Table 1 Gradient elution

时间/min	A (乙腈) /%	B (1%醋酸) /%
0	5	95
15	22.5	77.5
35	22.5	77.5
41	25.6	74.4
56	58	42
71	58	42
100	80	20
120	100	0

大黄蒽醌定量分析色谱条件：流动相（A）：甲醇，（B）：0.5%醋酸水溶液，梯度洗脱：0~20 min，A 为 65%~85%；柱温：35℃；体积流量 1

mL/min；检测波长 254 nm。理论塔板数：各对照品对应色谱峰理论塔板数不小于 4 000。

1.4 对照品溶液配制

分别精密称取 15 种对照品，加入甲醇溶解并定容，摇匀后分别得到芦荟大黄素 60 μg/mL、大黄酸 90 μg/mL、大黄素 100 μg/mL、大黄酚 140 μg/mL、大黄素甲醚 30 μg/mL、厚朴酚 50 μg/mL、和厚朴酚 50 μg/mL、木香炔内酯 110 μg/mL、去氢木香内酯 100 μg/mL、柚皮苷 50 μg/mL、橙皮苷 60 μg/mL、新橙皮苷 50 μg/mL、芸香柚皮苷 40 μg/mL、阿魏酸 45 μg/mL、藜本内酯 45 μg/mL 的对照品溶液，分别吸取各对照品溶液混合均匀作为混合对照品贮备液，用 0.45 μm 滤膜过滤后备用。

1.5 样品溶液配制

胃肠安丸甲醇提取液：取胃肠安丸粉碎成细粉，称取 1.0 g，置锥形瓶中，精密加甲醇 50 mL，称定质量，超声 60 min，放冷，加甲醇补足质量，过滤，取续滤液作为胃肠安丸甲醇提取液供试品。

胃肠安丸水解液：精密称定胃肠安丸粉末约 1.0 g，置 50 mL 具塞三角瓶中，加甲醇 25 mL，称定质量，加热回流 1 h，放冷，再称定质量，用甲醇补足质量，滤过，精密量取续滤液 20 mL，置于烧瓶中，挥去溶剂，加 8% HCl 溶液 10 mL，超声处理 2 min，加三氯甲烷 10 mL，加热回流 1 h，放冷，置于分液漏斗中，加少量三氯甲烷洗涤容器，并入分液漏斗中，分取三氯甲烷层，酸液再用三氯甲烷萃取 3 次，每次 10 mL，合并三氯甲烷液，减压回收溶剂至干，残渣加甲醇使之溶解，转移至 10 mL 容量瓶中，加入甲醇定容至刻度，摇匀，过滤，取续滤液，即得，微孔滤膜滤过，作为供试品溶液。另取处方药材（缺大黄）按照上述方法制备阴性对照品溶液。

2 结果

2.1 胃肠安丸中主要化学成分分析

结合保留时间、紫外光谱与质谱裂解规律，分析可得到胃肠安丸中的 12 个主要成分，分别为芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚、厚朴酚、和厚朴酚、木香炔内酯、去氢木香内酯、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷。其中木香炔内酯、去氢木香内酯来自于君药木香；厚朴酚、和厚朴酚来自于厚朴；柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷来自于枳壳；

芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚 5 个成分来自于大黄, 其结构式见图 1, 胃肠安丸甲醇提取液的 LC-MS 色谱图以及正负离子质谱图见图 2, 根据保留时间、紫外光谱与质谱裂解规律的分析结果见表 2。

2.2 胃肠安丸中泻下成分定量测定

2.2.1 标准曲线

对胃肠安丸中具有泻下作用的大黄蒽醌类成分进行定量测定, 所得标准曲线方程为: 芦荟大黄素 $Y=$

$8.587 \times 10^{-6}A + 0.1935$, $r=0.9998$; 大黄酸 $Y=1.618 \times 10^{-5}A + 0.2916$, $r=0.9999$; 大黄素 $Y=1.207 \times 10^{-5}A + 0.2904$, $r=0.9998$; 大黄酚 $Y=8.395 \times 10^{-6}A + 0.2100$, $r=0.9998$; 大黄素甲醚 $Y=1.393 \times 10^{-5}A + 0.0934$, $r=0.9999$, 线性范围分别为: 芦荟大黄素 $3.288 \sim 16.44 \mu\text{g/mL}$; 大黄酸 $9.08 \sim 45.4 \mu\text{g/mL}$; 大黄素 $13.92 \sim 69.6 \mu\text{g/mL}$; 大黄酚 $14.6 \sim 73.0 \mu\text{g/mL}$; 大黄素甲醚 $2.91 \sim 14.55 \mu\text{g/mL}$, 在此范围内样品浓度与峰面积呈良好的线性关系。

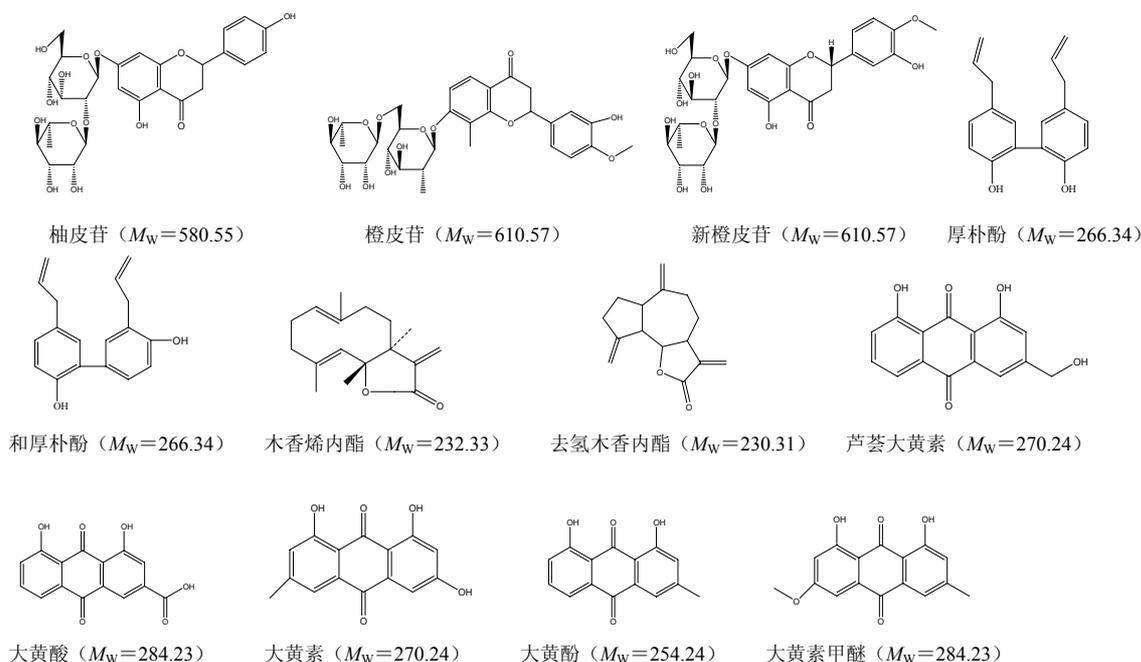


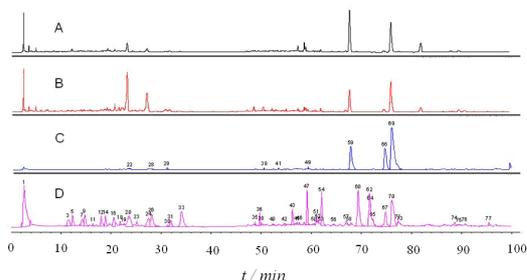
图 1 胃肠安丸中主要化学成分结构式

Fig.1 Structure of main components from Weichang'an Pill

表 2 胃肠安丸中主要化学成分质谱及紫外分析结果

Table 2 MS and UV analysis of main compounds from Weichang'an Pill

编号	保留时间/min	鉴定成分	裂解碎片	UV (λ_{max})
1	24.8	柚皮苷	581、435、419、273	284
2	26.1	橙皮苷	611、465、449、431、303	284
3	28.3	新橙皮苷	611、465、449、303	284
4	52.4	芦荟大黄素	269、240	257
5	54.5	大黄酸	283、257、239	257
6	58.6	大黄素	269、241、225	288
7	68.7	和厚朴酚	265、224	292
8	69.8	去氢木香内酯	233、185	213
9	71.6	木香烯内酯	231、187	213
10	76.8	大黄酚	253、225	256
11	77.4	厚朴酚	265、247	289
12	98.6	大黄素甲醚	283、268、240	265



A-254 nm 混合对照品 HPLC 色谱图; B-为 280 nm 混合对照品 HPLC 色谱图; C-混合对照品负离子总离子流色谱图; D-混合对照品负离子总离子流色谱图。

A-HPLC chromatogram of mixed reference substances at 254 nm; B- HPLC chromatogram of mixed reference substances at 280 nm; C-negative ion total ion chromatogram of mixed reference substances; D-negative ion total ion chromatogram of mixed reference substances

图 2 胃肠安丸甲醇超声提取物 LC-MS 色谱图

Fig.2 LC-MS Chromatogram of methanol extract of Weichang'an Pill

2.2.2 精密度试验

按 1.3 项下色谱条件, 取混合对照品溶液连续进样 6 次, 每次 20 μL, 依法测定, 记录混合对照品各组分峰面积值, 计算芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚的 RSD 值分别为 0.72%、0.82%、0.72%、0.91%、1.03% (n=6), 结果表明该仪器精密度较好。

2.2.3 重复性试验

取同一批号的胃肠安丸样品按照供试品溶液的制备方法配制溶液, 分别精密称取 5 份, 按 1.3 项下色谱条件, 依法测定, 记录混合对照品各组分峰面积值, 计算芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚质量分数的 RSD 值分别为 1.45%、0.81%、0.76%、1.33%、1.29% (n=5), 实验结果表明该方法重复性良好。

2.2.4 稳定性试验

取同一批号的胃肠安丸样品按照供试品溶液的制备方法配制溶液, 避光室温放置, 在 0、2、4、6、8、10、12 h 分别进样 20 μL, 按照 1.3 项下色谱条件, 依法测定, 记录与混合对照品相对应的各峰峰面积, 计算芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚 RSD 分别为 0.98%、0.87%、0.99%、0.85%、1.24%, 所得结果的 RSD 值均小于 2%, 表明供试样品溶液在 12 h 内稳定性良好。

2.2.5 加样回收率试验

精密称取已测定的同一批胃肠安样品约 1.0 g, 共 6 份, 分别置上述具塞三角瓶中, 精密吸取一

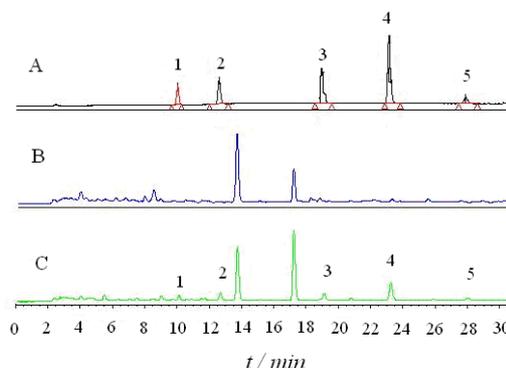
定量混合蒽醌对照品溶液, 混合均匀, 按照 1.3 项下色谱条件, 依法测定, 记录峰面积, 计算回收率, 结果芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚的加样回收率分别为 99.53%、100.69%、102.30%、101.33%、100.38%, RSD 分别为 1.33%、1.56%、1.93%、1.23%、1.15%。

2.2.6 空白试验

除大黄外按处方量称取其他药味, 按处方工艺制成不含大黄的制剂, 制成缺大黄的阴性空白对照液, 按照 1.3 项下色谱条件, 依法测定, 记录各峰峰面积。对照品、空白对照和供试品的 HPLC 色谱图见图 3, 由此证明其他药材中所含的成分在此检测条件下不干扰大黄蒽醌的测定。

2.2.7 样品测定

取 5 批胃肠安丸, 按 1.5 项下供试品溶液制备方法制成供试品溶液, 每批 3 份。精密吸取供试品溶液 20 μL, 进样测定, 按照 5 种蒽醌的标准曲线分别计算, 结果见表 4。通过对 5 批胃肠安丸中蒽醌类成分进行检测, 发现胃肠安丸中 5 种蒽醌的总量不少于 1.03 mg/g。



1-芦荟大黄素; 2-大黄酸; 3-大黄素; 4-大黄酚; 5-大黄素甲醚
1-aloeemodin; 2-rhein; 3-emodin; 4-chrysofanol; 5-phycion

图 3 对照品 (A)、空白对照品 (B) 和胃肠安丸供试品 (C) 的 HPLC 色谱图

Fig.3 HPLC Chromatogram of reference substances (A), blank group (B) and sample of Weichang'an Pill

3 讨论

胃肠安丸由 11 味中药组成, 药典中仅对厚朴中厚朴酚及和厚朴酚的量进行了限定, 凌宁生等^[2]又对其中的柚皮苷的量进行了测定, 通过测定 10 个批次的胃肠安样品发现胃肠安丸柚皮苷的量不少于 4.38 mg/g。然而对于方中具有泻下活性的大黄中蒽醌类成分的量并无报道, 由于胃肠安对于胃肠道

表 4 不同批次样品中 5 种蒽醌的定量测定结果 ($n=3$)

Table 4 Quantitative determination of five anthraquinones in different batches of Weichang'an Pill

样品批号	芦荟大黄素/ ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	大黄酸/ ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)	大黄素/ ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)	大黄酚/ ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)	大黄素甲醚/ ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)
D109002	79.673	292.873	167.560	378.143	111.842
D109004	80.121	295.296	168.509	378.906	112.065
D109009	81.072	293.065	171.342	379.928	114.312
D109010	80.766	292.957	167.566	379.006	114.055
D109020	81.565	295.846	171.544	380.767	112.548

功能具有双向调节作用,因此对于具有泻下活性的大黄蒽醌的量进行测定对于评价胃肠安丸的质量具有指导意义。

胃肠安丸方对于胃肠道功能具有双向调节的作用,药理实验结果证明胃肠安丸甲醇提取物能够使正常小鼠的小肠推进率增加,而使新斯的明致泻小鼠的小肠推进率明显降低。因此,对于便秘型肠易激综合征的患者也有一定的治疗作用^[3]。胃肠安丸中君药中木香的主要活性成分木香桉内酯和去氢木香内酯具有松弛平滑肌和解痉的作用,能够明显抑制小鼠肠蠕动^[4];臣药厚朴中主要活性成分厚朴酚对豚鼠末段结肠的推进具有明显抑制作用,提示其具有止泻作用,为中药厚朴治疗下消化道疾病的药理学基础之一;小肠炭末推进实验也证明厚朴酚能明显抑制小肠炭末推进率,说明其对小鼠的小肠运动具有抑制作用;还能明显减少番泻叶与蓖麻油引起的小鼠湿粪增加。说明其对番泻叶引起的肠道蠕动与分泌增加有明显抑制作用,对蓖麻油水解成蓖麻酸后引起水和电解质转运发生改变的过分泌反应有抑制作用,认为是胃肠安发挥止泻作用的物质基础之一^[5]。利用 LC-MS 法对方中主要成分进行了确定,为研究胃肠安丸的作用物质基础提供了依据。

由于胃肠安丸药味多,所含化合物种类繁多,

在选择流动相比例时,考察了乙腈-0.5%醋酸溶液,甲醇-0.5%醋酸溶液等度与梯度条件下样品分离效果,乙腈作为流动相时,调整流动相比例很难在短时间内将芦荟大黄素和大黄酸的 2 个色谱峰分开。多数对于复方中大黄蒽醌 HPLC 测定的色谱条件是采用甲醇-0.1%磷酸溶液(85:15)^[6],然而在测定胃肠安丸时等度条件下分离效果不理想,因此采用甲醇-0.5%醋酸水溶液梯度洗脱 20 min, 65~85%;之后以 85%等度洗脱,分离效果良好,而且分析时间短,测定能够在 30 min 内完成。试验结果表明,该方法能够简单、快速、准确的测定胃肠安丸中蒽醌类成分的量。

参考文献:

- [1] 中国药典[S]. 一部. 2005.
- [2] 凌宁生, 杨瑾, 律兆荣, 等. HPLC 法测定胃肠安丸中柚皮苷[J]. 中草药, 2005, 36(12): 1815-1816.
- [3] Hu J, Gao W Y, Ling N S, *et al.* Antidiarrhoeal and intestinal modulatory activities of Wei-Chang-An-Wan extract[J]. *J Ethnopharmacol*, 2009, 125(3): 450-455.
- [4] 张国华, 王贺玲. 木香对胃肠运动作用的影响及机制研究[J]. 中国现代实用医学杂志, 2004, 3(13): 24-26.
- [5] 朱自平, 张明发, 沈雅琴, 等. 厚朴对消化系统的药理作用[J]. 中国中药杂志, 1997, 22(11): 686.
- [6] 魏萍, 黄旭腾. 黄芩颗粒中 5 种蒽醌成分的 HPLC 测定[J]. 中成药, 2009, 31(12): 附 1-3.