

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2022.07.018

黄栀祛伤水质量标准研究*

朱 芹¹, 赵 娟^{1△}, 谢宏赞², 王 兴², 罗纯清²

(1. 湖南省湘潭市食品药品检验所, 湖南 湘潭 411000; 2. 湖南省湘潭市中医医院, 湖南 湘潭 411000)

摘要:目的 建立黄栀祛伤水的质量标准。方法 采用薄层色谱法对黄栀祛伤水中大黄、黄连、黄柏进行定性鉴别;采用高效液相色谱法测定方中盐酸小檗碱、栀子苷及丹皮酚的含量,色谱柱为 Waters Xterra C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为乙腈-0.25% 磷酸溶液(梯度洗脱),流速为 1.0 mL/min,检测波长为 238 nm(栀子苷)和 274 nm(盐酸小檗碱和丹皮酚),柱温为 30 ℃,进样量为 10 μL。结果 大黄、黄连、黄柏的薄层色谱图特征斑点显色清晰,分离效果良好,阴性对照无干扰。盐酸小檗碱、栀子苷及丹皮酚的质量浓度分别在 97.16~364.30 μg/mL($r=0.9997$)、50.60~189.70 μg/mL($r=0.9999$)、80.28~301.10 μg/mL($r=0.9998$)范围内与峰面积线性关系良好;检测限分别为 5.06, 2.97, 4.83 μg/mL,定量限分别为 15.89, 10.03, 14.57 μg/mL;精密度、稳定性、重复性试验的 RSD 均小于 2.0%;平均加样回收率分别为 99.49%, 100.13%, 100.02%, RSD 分别为 0.52%, 0.54%, 0.96%($n=9$)。结论 该方法操作简便,结果准确,灵敏度高,重复性好,拟订的质量标准为控制黄栀祛伤水的质量提供了参考。

关键词:黄栀祛伤水;大黄;黄连;黄柏;栀子苷;丹皮酚;盐酸小檗碱;质量标准

中图分类号:R932;R284.1;R286.0 文献标志码:A 文章编号:1006-4931(2022)07-0074-05

Quality Standard of Huangzhi Qushang Water

ZHU Qin¹, ZHAO Juan¹, XIE Hongzan², WANG Xing², LUO Chunqing²

(1. Xiangtan Food and Drug Inspection Institute, Xiangtan, Hunan, China 411000; 2. Xiangtan Hospital of Traditional Chinese Medicine, Xiangtan, Hunan, China 411000)

Abstract: **Objective** To establish a quality standard of Huangzhi Qushang Water. **Methods** Rhei Radix et Rhizoma, Coptidis Rhizoma and Phellodendri Chinensis Cortex in Huangzhi Qushang Water were identified by thin-layer chromatography (TLC) method. The contents of berberine hydrochloride, geniposide and paeonol in Huangzhi Qushang Water were determined by high-performance liquid chromatography (HPLC) method. The chromatographic column was Waters Xterra C₁₈ column (250 mm×4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was acetonitrile-0.25% phosphoric acid solution (gradient elution), the flow rate was 1.0 mL/min, the detection wavelength was 238 nm (geniposide) and 274 nm (berberine hydrochloride and paeonol), the column temperature was 30 ℃, and the injection volume was 10 μL. **Results** The TLC chromatographs of Rhei Radix et Rhizoma, Coptidis Rhizoma and Phellodendri Chinensis Cortex had clear spots and good separation, and the negative control had no interference. The linear ranges of berberine hydrochloride, geniposide and paeonol were 97.16-364.30 μg/mL ($r=0.9997$), 50.60-189.70 μg/mL ($r=0.9999$), 80.28-301.10 μg/mL ($r=0.9998$). The limits of detection (LOD) were 5.06, 2.97, 4.83 μg/mL, and the limits of quantitation (LOQ) were 15.89, 10.03, 14.57 μg/mL. The RSDs of precision, stability and repeatability tests were less than 2.0%. The average recoveries were 99.49%, 100.13%, 100.02% with RSDs of 0.52%, 0.54%, 0.96% ($n=9$). **Conclusion** The method is simple, accurate, sensitive and reproducible, which can provide a reference for controlling the quality of Huangzhi Qushang Water.

Key words: Huangzhi Qushang Water; Rhei Radix et Rhizoma; Coptidis Rhizoma; Phellodendri Chinensis Cortex; geniposide; paeonol; berberine hydrochloride; quality standard

*基金项目:湖南省中医药科研计划项目[201925]。

第一作者:朱芹,女,大学本科,副主任药师,研究方向为药品检验及药物分析,(电子信箱)zhuqin1221@163.com。

△通信作者:赵娟,女,大学本科,高级工程师,研究方向为药品质量标准及药物分析,(电子信箱)494784257@qq.com。

- Drug Delivery[J]. Acs Nano, 2009, 3(1): 16-20.
- [12] CHOI JW, OH BK, KIM YK, et al. Nanotechnology in biodevices[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2007, 17(1): 5-14.
- [13] ZHANG HJ, MEN K, PAN CB, et al. Treatment of Colon Cancer by Degradable rrPPC Nano-Conjugates Delivered STAT3 siRNA[J]. International Journal of Nanomedicine, 2020, 15: 9875-9890.
- [14] JAIMES JA, WHITTAKER GR. Feline coronavirus: Insights into viral pathogenesis based on the spike protein structure and function[J]. Virology, 2018, 517: 108-121.
- [15] STERNBERG A, NAUJOKAT C. Structural features of coronavirus SARS-CoV-2 spike protein: Targets for vaccination[J]. Life Sciences, 2020, 257: 118056.
- [16] YUE K, TRUJILLO-DE SANTIAGO G, ALVAREZ MM, et al. Synthesis, properties, and biomedical applications of gelatin methacryloyl (GelMA) hydrogels[J]. Biomaterials, 2015, 73: 254-271.
- [17] VIGATA M, MEINERT C, BOCK N, et al. Deciphering the Molecular Mechanism of Water Interaction with Gelatin Methacryloyl Hydrogels: Role of Ionic Strength, pH, Drug Loading and Hydrogel Network Characteristics[J]. Biomedicine, 2021, 9(5): 574.

(收稿日期:2021-08-26;修回日期:2021-12-16)

黄栀祛伤水为湖南省湘潭市中医医院的医院制剂,由黄连、黄柏、大黄、栀子、牡丹皮、红花、乳香、没药、薄荷、白矾10味中药组方,具有清热解毒、活血化瘀、消肿止痛功效,主治肢体损伤、肿胀疼痛伴灼热、红肿者。方中大黄、黄连、黄柏、栀子清热燥湿、泻火解毒,为君药^[1-3];牡丹皮清热凉血,乳香、没药活血消肿、化瘀止痛,红花活血化瘀,共为臣药^[4-5];薄荷、白矾疏散解表、透疹行气、燥湿止痒、解毒杀虫,为佐药^[6-7]。该方参考清代吴鞠通的《温病条辨》拟订,经多年临床实践验证,目前正在申报医院制剂批准文号,但尚无质量标准。为了全面、有效地控制黄栀祛伤水的质量,本研究中采用薄层色谱(TLC)法对方中黄连、黄柏、大黄进行定性鉴别,采用高效液相色谱(HPLC)法测定方中盐酸小檗碱、栀子苷、丹皮酚的含量。现报道如下。

1 仪器与试药

1.1 仪器

E2695型高效液相色谱仪(美国Waters公司),配有2998型二极管阵列检测器、2695型自动进样器,Empower3色谱工作站;ABS-135S型电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司,精度为0.01 mg);KQ-250DB型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司,功率为500 W,频率为40 kHz);明澈-D24UV纯水/超纯水一体化系统(德国默克密理博公司);硅胶G薄层板(青岛海洋化工有限公司)。

1.2 试药

黄栀祛伤水(湖南省湘潭市中医医院制剂室,批号分别为20210106, 20210211, 20210325,规格为每瓶500 mL);栀子苷、丹皮酚、盐酸小檗碱对照品(批号分别为110749-201919, 110708-201908, 110713-202015,纯度分别为97.1%, 99.8%, 85.9%),黄连、黄柏、大黄对照药材(批号分别为120913-201310, 121510-201807, 120902-201912),均购自中国食品

药品检定研究院;甲醇、乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 TLC鉴别

黄连^[8]:取样品20 mL,加甲醇100 mL,超声提取(功率为500 W,频率为40 kHz)30 min,滤过,取续滤液,作为供试品溶液。另取黄连对照药材0.25 g,同法制成对照药材溶液。按黄栀祛伤水处方工艺制备缺黄连的阴性样品,取5 mL,同法制成缺黄连药材的阴性对照品溶液。照2020年版《中国药典(四部)》通则0502 TLC法试验,吸取上述3种溶液各2 μ L,分别点于同一硅胶G薄层板上,以环己烷-乙酸乙酯-异丙醇-甲醇-水-三乙胺(30:35:10:15:5:10, V/V/V/V/V)为展开剂,置浓氨试液预饱和20 min的展开缸内,展开,取出,晾干,置紫外光灯(365 nm)下检视。供试品溶液色谱中,在与对照药材溶液色谱相应位置显相同颜色的荧光斑点,且阴性对照无干扰。详见图1 A。

黄柏^[9]:取样品30 mL,加1%醋酸甲醇溶液200 mL,于60 $^{\circ}$ C温度条件下超声提取(功率为400 W,频率为40 kHz)40 min,滤过,滤液浓缩至5 mL,作为供试品溶液。另取黄柏对照药材0.5 g,加1%醋酸甲醇溶液50 mL,同法制成对照药材溶液。按黄栀祛伤水处方工艺制备缺黄柏药材的阴性样品,同法制备阴性对照品溶液。照2020年版《中国药典(四部)》通则0502 TLC法试验,吸取上述3种溶液各5 μ L,分别点于同一硅胶G薄层板上,以三氯甲烷-甲醇-水(30:15:4, V/V/V)的下层溶液为展开剂,置氨蒸气饱和的展开缸内,展开,取出,晾干,日光下检视。供试品溶液色谱中,在与对照药材溶液色谱相应位置显相同颜色的斑点,且阴性对照无干扰。详见图1 B。

大黄^[10]:取样品20 mL,加甲醇100 mL,超声提取(功率为400 W,频率为40 kHz)40 min,滤过,取滤液

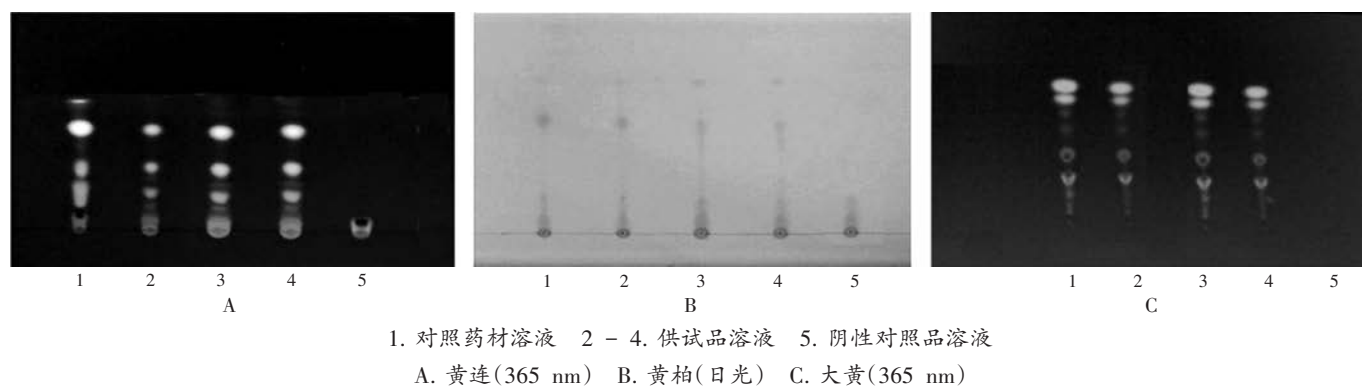


图1 薄层色谱图

1. Reference medicinal material solution 2-4. Test solution 5. Negative reference solution
A. Coptidis Rhizoma(365 nm) B. Phellodendri Chinensis Cortex(sunlight) C. Rhei Radix et Rhizoma(365 nm)

Fig. 1 TLC chromatograms

10 mL, 蒸干, 残渣加水 10 mL 使溶解, 再加盐酸 1 mL, 加热回流 30 min, 立即冷却, 用乙醚分 2 次振摇提取, 每次 20 mL, 合并乙醚液, 蒸干, 残渣加三氯甲烷 1 mL 使溶解, 作为供试品溶液。另取大黄对照药材 1.0 g, 同法制成对照药材溶液。按黄栀祛伤水处方工艺制备缺大黄药材的阴性样品, 同法制备阴性对照品溶液。照 2020 年版《中国药典(四部)》通则 0502 TLC 法试验, 吸取上述 3 种溶液各 5 μ L, 分别点于同一以羧甲基纤维素钠为黏合剂的硅胶 H 薄层板上, 以石油醚(30 ~ 60 $^{\circ}$ C) - 甲酸乙酯 - 甲酸(15:5:1, V/V/V) 的上层溶液为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 置紫外光灯(365 nm) 下检视。供试品溶液色谱中, 在与对照药材溶液色谱相应位置显相同的橙黄色荧光斑点, 且阴性对照无干扰。详见图 1 C。

2.2 含量测定

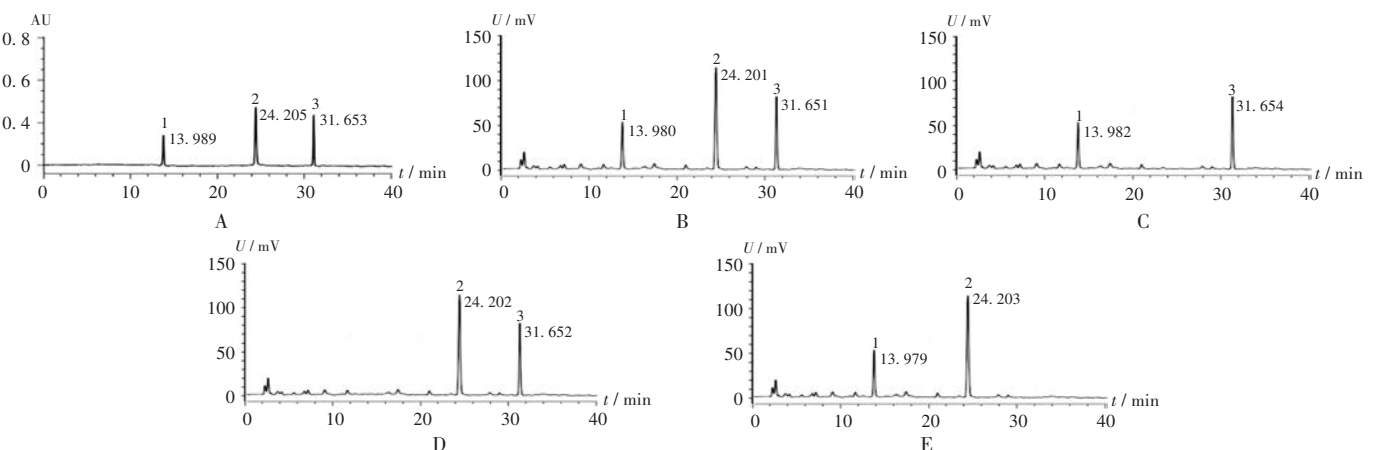
2.2.1 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱: Waters Xterra C₁₈ 柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m); 流动相: 乙腈(A) - 0.25% 磷酸溶液(B), 梯度洗脱^[11-14](程序见表 1); 流速: 1.0 mL/min; 检测波长: 238 nm(栀子苷)和 274 nm(盐酸小檗碱和丹皮酚); 柱温: 30 $^{\circ}$ C; 进样量: 10 μ L。在此色谱条件下的色谱图见图 2。理论板数以栀子苷峰计大于 5 000, 各待测成分与前后峰分离度均大于 1.5。

表 1 流动相梯度洗脱程序(%)

Tab. 1 Gradient elution program of the mobile phase(%)

时间	流动相 A	流动相 B	时间	流动相 A	流动相 B
0~10 min	12	88	20~28 min	16 $\rightarrow$ 32	84 $\rightarrow$ 68
10~20 min	12 $\rightarrow$ 16	88 $\rightarrow$ 84	28~40 min	32 $\rightarrow$ 45	68 $\rightarrow$ 55



1. 栀子苷 2. 盐酸小檗碱 3. 丹皮酚

A. 混合对照品溶液 B. 供试品溶液 C - E. 阴性对照品溶液(分别缺黄连、栀子、丹皮)

图 2 高效液相色谱图

1. Geniposide 2. Berberine hydrochloride 3. Paeonol

A. Mixed reference solution B. Test solution C - E. Negative control solution(lacking of Coptidis Rhizoma, Gardeniae Fructus and Moutan Cortex, respectively)

Fig. 2 HPLC chromatograms

2.2.2 溶液制备

取盐酸小檗碱对照品 24.29 mg、栀子苷对照品 12.65 mg 及丹皮酚对照品 20.07 mg, 精密称定, 置同一 50 mL 棕色容量瓶中, 加甲醇超声溶解并定容, 即得混合对照品溶液(室温避光保存, 备用)。取装量差异项下样品, 混匀, 精密量取 20 mL, 置 100 mL 棕色容量瓶中, 加甲醇适量, 超声处理(功率为 400 W, 频率为 50 kHz) 40 min, 放冷, 再加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得供试品溶液。按处方工艺, 分别制备缺黄连、栀子、丹皮的阴性样品, 并按供试品溶液制备方法分别制备阴性对照品溶液。

2.2.3 方法学考察

线性关系考察、检测限与定量限确定: 分别精密吸取 2.2.2 项下混合对照品溶液 4.0, 6.0, 8.0, 10.0, 12.0, 15.0 mL, 置同一 20 mL 棕色容量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 得盐酸小檗碱、栀子苷及丹皮酚质量浓度分别为 0.485 8, 0.253 0, 0.401 4 mg/mL 的系列对照品溶液。精密吸取上述系列对照品溶液, 按 2.2.1 项下色谱条件进样测定, 记录色谱图。以质量浓度(X, μ g/mL) 为横坐标、峰面积(Y) 为纵坐标进行线性回归。将对照品溶液逐级稀释, 以信噪比(S/N) 为 3.0 时的质量浓度为各成分的检测限, 以 S/N 为 10.0 时的质量浓度为各成分的定量限。结果见表 2。

精密度试验: 精密吸取 2.2.2 项下混合对照品溶液 10 μ L, 按 2.2.1 项下色谱条件连续进样测定 6 次, 记录峰面积。结果盐酸小檗碱、栀子苷及丹皮酚峰面积的 RSD 分别为 0.55%, 0.62%, 0.71% (n = 6), 表明仪器精密度良好。

表 2 线性关系考察、检测限与定量限确定结果($n = 6$)

Tab. 2 Results of linear relationship test, LOD and LOQ($n = 6$)

成分	回归方程	r	线性范围 ($\mu\text{g/mL}$)	定量限 ($\mu\text{g/mL}$)	检测限 ($\mu\text{g/mL}$)
盐酸小檗碱	$Y = 106.8 X + 19.14$	0.999 7	97.16~364.30	15.89	5.06
栀子苷	$Y = 182.7 X - 42.16$	0.999 9	50.60~189.70	10.03	2.97
丹皮酚	$Y = 110.6 X + 21.02$	0.999 8	80.28~301.10	14.57	4.83

稳定性试验:取同一批(批号为 20210106)样品,按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液,分别于常温下放置 0, 3, 6, 9, 15, 20, 24 h 时按 2.2.1 项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果盐酸小檗碱、栀子苷及丹皮酚峰面积的 RSD 分别为 1.25%, 0.94%, 1.03% ($n = 7$), 表明供试品溶液在常温下 24 h 内稳定性良好。

表 3 加样回收试验结果($n = 9$)

Tab. 3 Results of recovery test($n = 9$)

取样量 (mL)	样品含量(mg)			加入量(mg)			测得量(mg)			回收率(%)			$\bar{X}$ (%)			RSD (%)		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C
10.00	11.870	6.741	8.207	9.468	5.116	6.516	21.25	11.85	14.81	99.07	99.86	101.34						
10.00	11.870	6.741	8.207	9.468	5.116	6.516	21.26	11.90	14.72	99.18	100.84	99.95						
10.00	11.870	6.741	8.207	9.468	5.116	6.516	21.35	11.86	14.66	100.13	100.06	99.03						
10.00	11.870	6.741	8.207	11.550	6.762	8.198	23.31	13.53	16.36	99.05	100.40	99.45						
10.00	11.870	6.741	8.207	11.550	6.762	8.198	23.40	13.47	16.52	99.83	99.51	101.40	99.49	100.13	100.02	0.52	0.54	0.96
10.00	11.870	6.741	8.207	11.550	6.762	8.198	23.34	13.56	16.33	99.31	100.84	99.09						
10.00	11.870	6.741	8.207	14.390	8.189	9.902	26.24	14.91	18.01	99.86	99.76	99.00						
10.00	11.870	6.741	8.207	14.390	8.189	9.902	26.29	14.97	18.14	100.21	100.49	100.31						
10.00	11.870	6.741	8.207	14.390	8.189	9.902	26.09	14.88	18.17	98.82	99.39	100.62						

注:A 为盐酸小檗碱,B 为栀子苷,C 为丹皮酚。

Note: A is berberine hydrochloride, B is geniposide, C is paeonol.

2.2.4 样品含量测定

取 3 批样品,按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液,再按 2.2.1 项下色谱条件进样测定,采用外标法计算样品中盐酸小檗碱、栀子苷及丹皮酚的含量。结果见表 4。

表 4 3 批样品含量测定结果(mg/mL , $n = 3$)

Tab. 4 Results of content determination of ingredients in the three batches of samples(mg/mL , $n = 3$)

批号	盐酸小檗碱	栀子苷	丹皮酚
20210106	1.187 0	0.674 1	0.820 7
20210211	1.159 0	0.671 6	0.819 2
20210325	1.196 0	0.681 1	0.829 9

3 讨论

3.1 TLC 条件选择

对黄连、黄柏、大黄进行定性鉴别时,分别考察了不同品牌(青岛海洋、上海邦凯)的薄层板、不同温度(室温、2~10℃)、相对湿度(40%, 50%~60%, 75%)条件下展开的效果,以及不同检视方式(日光、紫外光灯)的显色效果,最终确定为 2.1 项下 TLC 条件。

重复性试验:取同一批(批号为 20210106)样品 6 份,按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液,按 2.2.1 项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算质量浓度。结果盐酸小檗碱、栀子苷及丹皮酚的平均质量浓度分别为 1.187 0, 0.674 1, 0.820 7 mg/mL , RSD 分别 1.24%, 0.96%, 0.89% ($n = 6$), 表明方法重复性良好。

加样回收试验:取已知含量的样品(批号为 20210106) 9 份,分为 3 组,各 3 份,每份精密量取 10 mL,每组按供试品中盐酸小檗碱、栀子苷及丹皮酚含量的 80%, 100%, 120% 精密加入相应对照品,按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液,再按 2.2.1 项下色谱条件进样测定,记录色谱图,并计算加样回收率。结果见表 3。

3.2 色谱条件选择

为保证各成分在各自最佳吸收波长处被检测到,并达到同时检测 3 种有效成分的目的,采用二极管阵列检测器于 190~400 nm 波长范围内测定混合对照品溶液和供试品溶液,最终确定采用分段变换波长检测,在 238 nm 波长处检测栀子苷,在 274 nm 波长处检测盐酸小檗碱及丹皮酚。分别考察了不同洗脱体系(乙腈-水、乙腈-磷酸溶液、甲醇-水、甲醇-磷酸溶液),以及不同梯度、不同比例的洗脱条件,不同柱温(25, 30, 35℃),不同品牌色谱柱(Waters Xterra C₁₈ 柱、Agilent Zorbax C₁₈ 柱、Ultimate XB-C₁₈ 柱),不同浓度提取溶剂(甲醇、50% 甲醇、80% 甲醇),不同提取时间(35, 40, 45 min)的提取效果,最终确定为 2.2.1 项下色谱条件。

3.3 指标性成分选择

参照 2020 年版《中国药典(一部)》^[15] 中单味中药的质量标准,黄连和黄柏、栀子、牡丹皮的指标性成分分别为盐酸小檗碱、栀子苷、丹皮酚,故确定采用高效液相色谱法同时测定 3 种化学成分,以控制黄栀子伤水