

青黄散的几种药味的显微、定性鉴识和黄柏的含量测定

柳克浩

(济南市食品药品检验检测中心 山东济南 250000)

摘要:目的 对青黄散中的药味进行显微、定性鉴识、含量测定。方法 分别对处方中的黄柏、白芷、青黛做了显微鉴识,黄柏、白芷的定性鉴识和黄柏中盐酸小檗碱的含量限度探索。结果 显微图谱和定性图谱分离清晰,特征明显;盐酸小檗碱在 0.02~0.5 μg (r=0.9999) 的范围内线性关系良好,平均回收率为 98.91% (n=6), RSD 为 0.88%,符合分析方法验证指导原则。结论 该研究对青黄散的显微、定性鉴识、含量测定有较大扩展,加强了该药的质量控制。

关键词:青黄散;显微;定性;含量测定

Microscopic and Qualitative Identification of Several Medicinal Taste of Qinghuang Powder and Determination of Cortex Phellodendri

LIU Ke-hao

(Jinan Center for Food and Durg Control, Jinan 250000, China)

Abstract : Objective To conduct microscopic, qualitative identification and content determination of the medicinal herbs in Qinghuang Powder. Methods The microscopic identification of Cortex Phellodendri, Radix Angelicae Dahuricae and Daidzee in the prescription, the qualitative identification of Radix Angelicae Dahuricae and the content limit of berberine hydrochloride in Cortex Phellodendri were explored. Results The microscopic map and qualitative map were clearly separated and characterized. Berberine hydrochloride had a good linear relationship in the range of 0.02-0.5 μg (r = 0.9999). The average recovery was 98.91 % (n = 6), RSD was 0.88 %, which conformed to the guiding principle of analysis method. Conclusion This study has greatly expanded the microscopic, qualitative identification and content determination of Qinghuang Powder, and strengthened the quality control of the drug.

Keywords : Qinghuang Powder ; microscopic ; qualitative ; content determination

青黄散为济南市某医院医院制剂品种,1996年3月20日起试行,现执行标准编号为鲁药制 ZBZ1928,是一种主要皮肤病、肿痒痛出水者的散剂。该方由白芷、青黛、煅蛤壳、黄柏、枯矾、雄黄、冰片等七味组成,具有清热、燥湿、止痒的作用。原方青黄散为解毒的古方,《景岳全书》、《世医得效方》、《奇效良方》中均有记载,由雄黄、青黛组成,周霁祥等用原方治疗白血病效果好^[1-2]常用多为此方。根据雄黄和青黛的比例,作用效果不同^[3]。《仙拈集》卷三记载青黄散为黄柏(蜜炙赤)、青黛,主要为于口疮外用。该制剂标准目前仅制定黄柏的显微鉴别,黄柏的 TLC 鉴别。不过该药目前的质量标准研究较为简单,缺乏对主要药味的控制,基于以上情况,进行试验,完成了黄柏、青黛、白芷的显微鉴识,白芷的定性鉴识和黄柏的含量测定项目,步骤和结果如下。

1 仪器与试药

1.1 仪器 LC-20A 高效液相色谱系统(紫外检测器,日本岛津);薄层色谱 GOODSEE-20E 照相(上海科哲生化),电子分析万分之一天平(梅特勒-托利多国际有限公司,瑞士),KQ-250DE 超声波振荡器(昆山超声仪器),BX51 照相显微镜(日本 OLYPUS)。

1.2 试药 青黄散(批号 150311、150316、150320);盐酸小檗碱对照品(批号:110713-200910,中国食品药品检定研究院,以下均为同一来源);黄柏对照药材(批号:121510-201105);白芷对照药材(批号:120945-201510);乙腈为色谱纯,水为现制超纯水,其余试剂纯度为分析纯。

2 方法与结果

2.1 显微鉴识

2.1.1 黄柏的显微鉴识。结果如图 1~3:

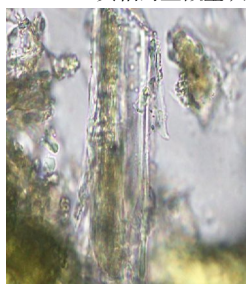


图 1 纤维

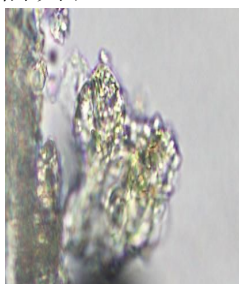


图 2 石细胞

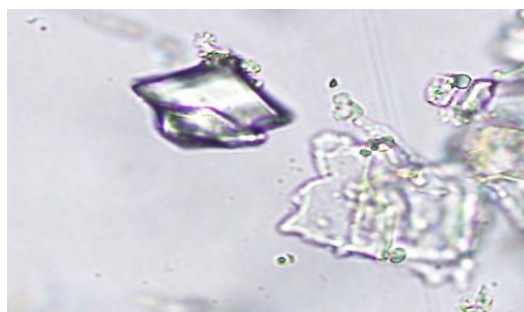


图 3 方晶

2.1.2 白芷、青黛的显微鉴识,结果如图 4~6。

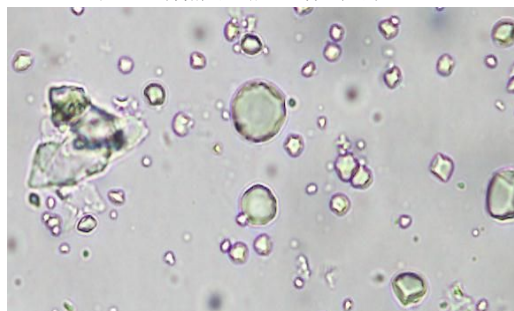


图 4 白芷淀粉

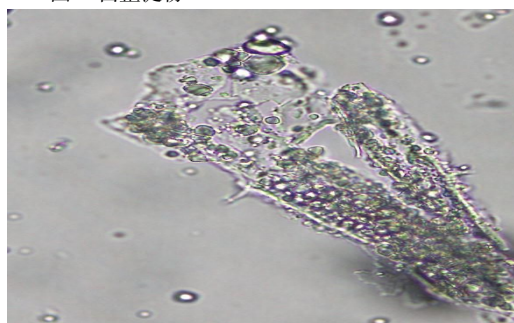


图 5 白芷油管碎片

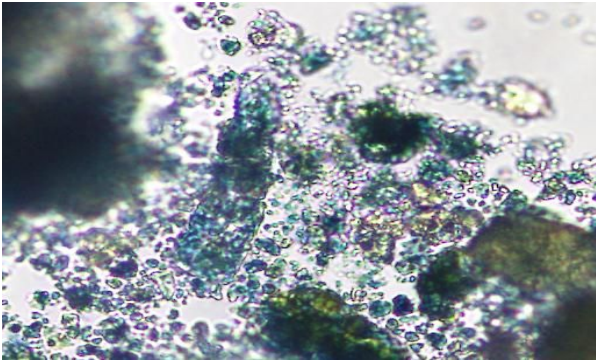
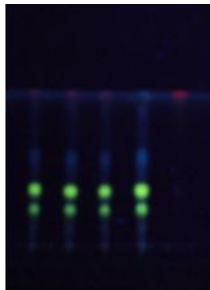


图6 青黛块片, 颗粒
2.2 定性鉴识

2.2.1 黄柏薄层鉴识 取本品粉末 0.5 g, 放入锥形瓶, 量取甲醇 10 mL 加入其中, 放于水浴锅上 70 °C 加热, 冷凝回流持续 30 min, 使用定性滤纸进行过滤, 所得滤液就是需要的试样。另称量黄柏对照药材 0.5 g, 量取甲醇 5 mL 加入其中, 按照同样的处理方法得到对照药材试样。掉黄柏按照处方生产要求进行配制的阴性对照试样 0.5 g, 按样品的处理方法操作得到相应的阴性对照试样。进行定性试验, 用毛细管吸三种溶液各 10 μL, 按照试样、对照药材、阴性试样的顺序点在一块硅胶 G 薄层板上, 跑板使用的溶剂为乙酸乙酯-丁酮-甲酸-水(10:6:1:1)于冰箱中 4 °C 静置分层的下层溶液 20 mL, 并预先进行氨蒸气饱和。溶剂前线到达 10~12 cm 时快速拿出薄层板并放在通风橱中静置 10~15 min, 采用 365 nm 紫外照射观察, 样品和对照品色谱相应的水平线上, 显相同颜色的荧光点状样式图斑, 阴性对照液在对应的水平线上无点状样式图斑, 见图 7。



温度: 20°C, 相对湿度: 35%
薄层板: 青岛海洋化工厂分厂生产的硅胶 G 板
1 供试品 150311
2 供试品 150316
3 供试品 150320
4 黄柏对照药材
5 缺黄柏阴性对照

图7 黄柏 TLC (紫外灯 365nm)

2.2.2 白芷的 TLC 鉴识 取本品 1 g, 放入锥形瓶中, 量取甲醇 20 mL 加入其中, 放入超声仪器中 80% 功率运行 0.5 h, 使用定性滤纸进行过滤, 滤液于蒸发皿中水浴蒸发到干, 剩余干燥物用水 10 mL, 摇动, 使溶解, 使用定性滤纸进行过滤, 滤液于分液漏斗中加乙醚 10 mL, 实行振荡提取操作 2 次, 将所得到的乙醚提取液混合在一起, 放在通风橱内低温下挥散溶剂到完全干燥, 剩余干燥物用甲醇 2 mL, 摇动, 使溶解, 就是需要的试样。另称量白芷对照药材 1 g, 量取甲醇 20 mL 加入其中, 放入超声仪器中 80% 功率运行 30 min, 使用定性滤纸进行过滤, 滤液于蒸发皿中水浴浓缩到剩余约 2 mL, 作为对照药材试样。掉白芷按照处方生产要求进行配制的阴性对照试样 1 g, 按样品的处理方法操作得到相应的阴性对照试样。进行定性试验, 用毛细管吸三种溶液各 10 μL, 按照对照药材、试样、阴性试样的顺序点在一块硅胶 G 薄层板上, 跑板使用的溶剂为甲苯-乙酸乙酯-甲酸(5:3:1)20 mL。溶剂前线到达 8~10 cm 时快速拿出薄层板并放在通风橱中静置 10~15 min, 采用 254 nm 紫外照射观察, 样品和对照品色谱相应的水平线上, 显相同颜色的荧光点状样式图斑, 阴性对照液在对应的水平线上无点状样式图斑, 见图 8。

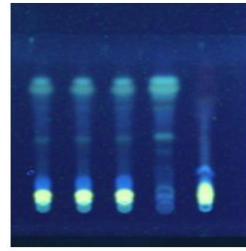


图8 白芷 TLC (紫外灯 254nm)
2.3 含量测定
2.3.1 色谱条件

LC-20A 高效液相色谱系统, 色谱柱: InertSustain C18 (4.6 mm × 150 mm, 5 μm); 将乙腈-0.1% 磷酸溶液 (40:60) (每 100 mL 溶液中需要混入十二烷基磺酸钠 0.1 g) 混合均匀, 抽滤脱气后作为流动相; 柱温箱的温度设定为 30 °C; 液相的流动速度设定为 1.0 mL·min⁻¹; 检测所使用的紫外段波长定为 265 nm; 自动进样的体积设定为 5 μL。系统适用性的要求中, 理论板数按盐酸小檗碱峰计算规定为应不低于 4000。

2.3.2 对照品溶液的制备

将完整瓶装的盐酸小檗碱对照品破开后使用, 称量精确到小数点后五位, 将 10 mg 溶质溶解到 10 mL 容量瓶里面, 再用 1 mL 大肚移液管量取后加入到 50 mL 容量瓶中, 加流动相稀释到刻度线, 就得到了对照品溶液。

2.3.3 样品溶液的制备

取样品 3 包, 全部混合在一起拌匀, 称取 0.25 g, 称量精确到小数点后四位, 放入锥形瓶, 用 25 mL 大肚移液管量取流动相后加入, 盖上玻璃塞, 记录重量, 放入超声仪器中 70% 功率运行 1 h, 取出, 静置 15 min, 再称量记录, 用流动相将超声中损失的重量调整到原来的水平, 顺时针摇晃 3 min, 使用定性滤纸进行过滤, 取第二次过滤时的溶液, 就得到了样品的溶液。

2.3.4 阴性对照溶液的制备

取不含黄柏按青黄散工艺生产的溶液以“2.3.3”方法处理制成阴性对照溶液。

2.4 方法学考察

2.4.1 线性范围 设置程序, 使用仪器的自动进样针, 将实验浓度为 0.02 mg/mL 的盐酸小檗碱对照品溶液泵入高效液相色谱仪, 进样体积依次设定是 2 μL、5 μL、10 μL、15 μL、25 μL, 记录仪器自动测定出的峰面积积分数值。以盐酸小檗碱的具体进样体积时的重量 (g) 当作横坐标即 X, 对应的盐酸小檗碱峰面积积分数值为纵坐标即 Y, 利用 Excel 表格进行线性回归计算, 得到一个具体的回归方程如下。测定结果见表 1。

表 1 盐酸小檗碱线性关系考察结果

进样量 (μg)	0.04	0.1	0.2	0.3	0.5
峰面积	130148	328952	660705	989608	1643107

回归方程 $y = 3E+06x + 598.25$, 相关系数 $r = 0.9999$ 。

根据结果计算可以得出结论, 即盐酸小檗碱在 0.02~0.5 μg 的实验范围时, 线性关系良好, 可以进行下一步的操作。标准曲线见图 9。

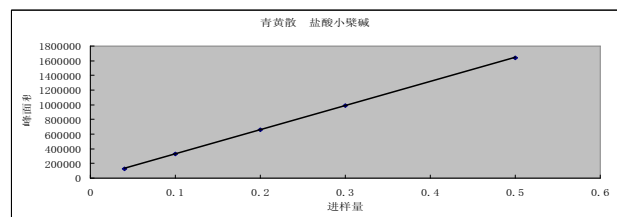


图9 盐酸小檗碱标准曲线

2.3.2 系统重复性试验 设置程序, 使用仪器的自动进样针, 将

实验浓度为 0.02 mg/mL 的盐酸小檗碱对照品溶液 5 μL 泵入高效液相色谱仪, 重复操作共计 6 次, 记录仪器自动测定出的峰面积积分数值。具体数据见表 2。

表 2 盐酸小檗碱精密度试验结果

编号	1	2	3	4	5	6
峰面积	339390	339751	337898	336394	335018	334117
RSD (%)	0.685					

根据以上的表格数值可以得出结论, 系统重复性可以满足下一步实验的要求。

2.3.3 稳定性试验 取本品 3 包 (批号:150320), 照“2.3.3”方法依次制备的供试品溶液。记录时间, 设定程序, 每 5 h 自动进样一遍, 每次进样体积设定在 5 μL, 测定每一遍的积分数值, 共考察 25 h。具体结果见表 3。

表 3 稳定性试验结果盐酸小檗碱

保存时间	0h	5h	10h	15h	20h	25h
峰面积	1323795	1323839	1324111	1331102	1330538	1336706
RSD (%)	0.400					

根据以上的表格数值可以得出结论, 即该样品溶液在 25 h 内稳定性能够满足下一步实验的需要。

2.3.4 精密度考察 供试品溶液的制备: 取本品 3 包 (批号:150320), 照“2.3.3”方法依次制备的供试品溶液, 平行制备 6 份。设定程序, 将样品溶液进行测定, 每次进样体积设定在 5 μL, 依次泵入液相色谱仪, 记录仪器自动测定出的峰面积积分数值, 采用 Excel 表格进行计算。结果见表 4。

表 4 重复性考察结果

编号	取样量 (g)	含量 (mg/g)	平均含量 (mg/g)	RSD (%)
1	0.2509	7.9113		
2	0.2505	7.9687		
3	0.2506	8.0183	7.999	0.86
4	0.2511	7.9469		
5	0.2501	8.0733		
6	0.2507	8.0776		

根据以上的表格数值可以得出结论, 含量测定方法的精密度良好。

2.3.5 加样回收率试验 取已经经过了含量测定的本品 3 包 (批号:150320, 盐酸小檗碱对照品溶液含量为 7.999 mg/g), 称 0.125 g, 称量精确到小数点后四位, 放入锥形瓶, 用 50 mL 大肚移液管量取盐酸小檗碱对照品溶液 (0.02 mg/mL) 加入, 盖上玻璃塞, 记录此时的重量, 放入超声仪器中 70% 功率运行 1 h, 取出, 静置 15 min, 再称量记录, 用流动相将超声中损失的重量调整到原来的水平, 顺时针摇晃 3 min, 使用定性滤纸进行过滤, 取第二次过滤时的溶液, 就得到了混合对照品的样品溶液。设定程序, 将混合后的溶液进行测定, 每次进样体积设定在 5 μL, 依次泵入液相色谱仪, 记录仪器自动测定出的峰面积积分数值, 采用 Excel 表格进行计算。结果见表 5。

表 5 加样回收率考察结果

编号	取样量 (g)	样品中含 量 (mg)	对照品加 入量 (mg)	测得量 (mg)	回收率 (%)	平均 (%)	RSD (%)
1	0.1254	1.0031	1.0	1.9850	98.19		
2	0.1251	1.0007	1.0	1.8999	99.92		
3	0.1252	1.0015	1.0	1.9012	98.97	98.91	0.88
4	0.1253	1.0023	1.0	1.8889	98.66		
5	0.1250	0.9999	1.0	1.9001	99.92		
6	0.1251	1.0007	1.0	1.9201	97.82		

试验结果表明, 测定方法的准确度良好, 能够满足下一步实验

的要求。

2.3.6 专属性试验

2.3.6.1 对照品溶液的制备: 同“2.3.2”的方法。

2.3.6.2 供试品溶液的制备: 同“2.3.3”项下的方法。

2.3.6.3 阴性对照溶液的制备: 同“2.3.4”项下的方法。

设置程序, 使用仪器的自动进样针, 将上述对照品溶液、供试品溶液及阴性对照溶液各 5 μL 泵入高效液相色谱仪, 记录图谱。从图中可以得出结论, 样品和对照品色谱保留时间同样的位置上, 出现了盐酸小檗碱的色谱峰, 同时阴性对照色谱中没有出现色谱峰。证明此方法可以很好的区分是否在生产中对黄柏进行了投料。见图 10~12。

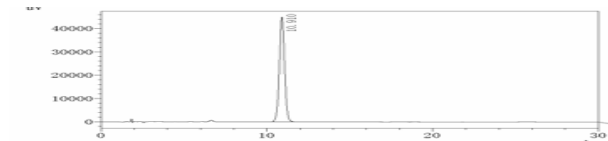


图 10 盐酸小檗碱对照品

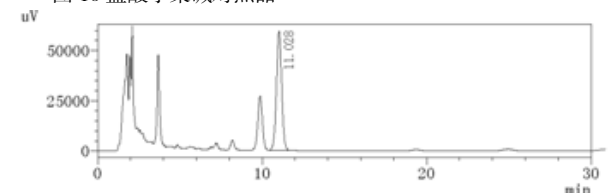


图 11 供试品

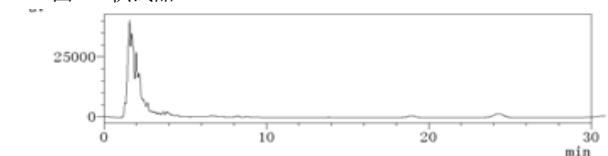


图 12 阴性溶液

2.3.7 样品测定 按“2.3.1”规定好的实验方法和条件设定进样程序并附带设置进样完毕后的清洗程序, 得到批处理文件, 执行程序。对所有的 3 批样品进行测定, 记录仪器自动测定出的峰面积积分数值, 采用 Excel 表格进行计算。结果见表 6。

表 6 盐酸小檗碱含量测定结果 (n=2)

批号	含量 1 (mg/g)	含量 2 (mg/g)	平均含量 (mg/g)
150311	7.9447	7.9880	7.9888
150316	7.9995	7.9880	7.9881
150320	8.0457	8.0497	8.0333

通过表格中的数值范围, 并参考固经丸^[9]项下的含量测定, 定含量限度为 5 mg/g, 与通过处方药味重量及百分比测算含量限度一致, 故暂定青黄散每 1 g 含黄柏通过盐酸小檗碱 (C₂₀H₁₇NO₄ · HCl) 为准, 应该不能少过 5 mg, 这样才能真实地反映原材料的质量和投料是否充分。

3. 讨论

3.1 本实验参考药典方法及有关文献[4-8], 分别对黄柏、白芷进行定性鉴别, 各方法所得图谱上点状图斑分离清晰, 耐用性考察 (不同品牌薄层板) 良好。用 HPLC 法测定了黄柏中盐酸小檗碱的含量。考察了 Agilent 1200、Shimadzu LC-20A 2 个色谱系统与 Inertsil ODS-3(4.6 mm × 250 mm, 5 μm); Agilent 5 TC-C18(4.6 mm × 150 mm, 5 μm); Agilent Eclipse XDB-C18(4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 3 种品牌的色谱柱的实际检验效果, 得出结论即不同色谱系统和不同的色谱柱对实际检验结果影响在可接受的范围内, 每个柱子的分离效能、理论板数等均能达到实验要求的数值。

3.2 不足之处, 本方含有矿物药雄黄, 由于实验条件限制, 未能开展砷的 HPLC-ICP-MS 检查项目。

(下转第 23 页)

(上接第 17 页)

3.3 医院制剂标准的提高工作十分重要,由于自身条件限制等因素,医院制剂一般存在着这样或那样的问题[9-10],但总体来讲目前发展机遇较好[11-12],抓好了制剂成品的质量才能更好地保证疗效,从这方面来讲,严格的质量标准对于医院来讲是一个压力也是推动力。

参考文献:

- [1] 周霁祥. 青黄散治疗白血病的研究[J]. 中国中西医结合杂志, 1998, 18(10):2.
- [2] 胡晓梅, 刘锋, 麻柔, 等. 周霁祥运用青黄散治疗白血病的经验[J]. 中医杂志, 2011, 52(14):3.
- [3] 张敏, 吴青青, 李晨辉, 等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS/MS 技术分析不同配伍比例雄黄对青黛入血成分的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(13):8.
- [4] 国家药典委员会. 中国药典 2020 年版(一部)[S]. 北京:中国医药科技出版社, 2020.
- [5] 王苏会, 闫荟, 王瑞, 等. 护胃散质量标准研究[J]. 中国医药

导刊, 2010(12):2188-2190.

- [6] 姜芳宁, 刘光斌. 柏芷熏洗散的质量标准研究[J]. 甘肃医药, 2018, 37(12):3.
- [7] 林传辉, 余关厚, 利超媚. 消肿活络散中白芷、透骨草、独活、川芎的薄层色谱鉴别[J]. 首都食品与医药, 2016(8):2.
- [8] 张晓娟, 郭琪, 申睿, 等. 海金护卫散质量标准研究* [J]. 医药导报, 2016, 035(007):776-779.
- [9] 杨秋明. 影响医院中药制剂质量的因素及控制措施[J]. 中国医药指南, 2011, 9(9):2.
- [10] 周卫忠, 韩志祥. 基层医院中药制剂存在的问题及建议[J]. 中国药业, 2014, 23(8):3.
- [11] 陈增修, 谢欣辛. 医院中药制剂现状与发展路径探讨[J]. 医药前沿, 2021, 11(2):2.
- [12] 崔一然, 吴剑坤. 基于名老中医经验处方的医院中药制剂发展现状及转化策略[J]. 中华中医药杂志, 2021.