

UPLC-DAD 法测定乌蛇止痒丸中蛇床子素、苍术素和盐酸小檗碱

李华丽, 王胜杰*, 叶晓娅, 王小龙

平顶山市食品药品检验所, 河南 平顶山 467000

摘要:目的 建立乌蛇止痒丸中蛇床子素、苍术素和盐酸小檗碱的 UPLC-DAD 法。方法 Waters Acquity Beh C₁₈ 色谱柱 (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm); 检测器: DAD 检测器; 流动相为乙腈-0.1%磷酸溶液, 梯度洗脱; 检测波长: 331 nm; 体积流量: 1.0 mL/min; 柱温: 30 °C; 进样体积: 25 μL。结果 盐酸小檗碱、苍术素和蛇床子素分别在 8.954~447.700、3.980~199.000、8.670~433.500 μg/mL 具有良好的线性 ($r \geq 0.995$); 盐酸小檗碱、苍术素、蛇床子素平均回收率分别为 99.69%、98.78%、99.38%, RSD 值分别为 1.9%、1.6%、1.5%。结论 本法具有快速、准确、简便等特点, 为进一步提高乌蛇止痒丸的质量控制提供技术参考。

关键词: 乌蛇止痒丸; 蛇床子素; 苍术素; 盐酸小檗碱; UPLC-DAD

中图分类号: R284 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2021)12-2507-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2021.12.007

Determination of osthol, atracylodin, and berberine hydrochloride in Wushe Zhiyang Pills by UPLC-DAD

LI Hua-li, WANG Sheng-jie, YE Xiao-ya, WANG Xiao-long

Pingdingshan Institute for Food and Drug, Pingdingshan 467000, China

Abstract: Objective To explore a method for determination of osthol, atracylodin, and berberine hydrochloride in Wushe Zhiyang Pills by UPLC. **Methods** The HPLC method was carried out on Waters Acquity Beh C₁₈ column (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm). Detector was selected as DAD. The mobile phase was consisted of acetonitrile - 0.1% phosphoric acid solution with gradient elution. The detection wavelength was set at 331 nm. The flow rate was 1.0 mL/min, temperature of column was set at 30 °C, and the volume of injection was 25 μL. **Results** Berberine hydrochloride, atracylodin, and osthole showed good linear relationships in concentration range 8.954 — 447.700 μg/mL, 3.980 — 199.000 μg/mL, and 8.670 — 433.500 μg/mL ($r \geq 0.995$). Average recoveries of samples were 99.69%, 98.78%, and 99.38% with RSD values as 1.9%, 1.6%, and 1.5%, respectively. **Conclusion** This method is fast, accurate, and simple, which provides a technical reference for improving the quality control of Wushe Zhiyang Pills.

Key words: Wushe Zhiyang Pills; osthol; atracylodin; berberine hydrochloride; UPLC-DAD

乌蛇止痒丸系由乌梢蛇、防风、蛇床子、关黄柏、苍术、红参须、牡丹皮、蛇胆汁、苦参、人工牛黄、当归 11 味中药经煎煮、滤过、浓缩、混合、干燥、粉碎等工艺制备而成的中药丸剂, 具有养血祛风、燥湿止痒的功效, 用于治疗风湿热邪蕴于肌肤所致的瘾疹、风瘙痒等病症, 如皮肤风团色红、时隐时现、瘙痒难忍, 或皮肤瘙痒不止、皮肤干燥、无原发皮疹, 慢性荨麻疹、皮肤瘙痒症等^[1-3]。王蔚等^[4]研究了 RP-HPLC 法测定乌蛇止痒丸中小檗碱的分析方法以控制乌蛇止痒丸的质量。郑晓晴等^[5]

修订了乌蛇止痒丸的质量标准, 增加了 4 种药材的薄层色谱鉴别方法, 仍采用高效液相色谱法测定小檗碱, 提升乌蛇止痒丸的质量控制水平。乌蛇止痒丸现收载于《中国药典》2015 年版一部^[6], 标准中仅针对关黄柏药材中小檗碱进行含量测定, 不能全面反映乌蛇止痒丸的质量水平。为了保障用药安全, 本实验参考相关文献报道^[7-11], 建立了测定乌蛇止痒丸中蛇床子素、苍术素和盐酸小檗碱的 UPLC 法, 为进一步提高乌蛇止痒丸的质量控制水平提供技术参考。

收稿日期: 2021-09-01

作者简介: 李华丽 (1973—), 女, 河南内乡人, 副主任药师, 本科, 从事中药检验工作。E-mail: tianqin661730841@163.com

*通信作者: 王胜杰 (1989—), 男, 河南叶县人, 助理工程师, 硕士, 从事食品药品质量检验。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Agilent 1290 型高压液相色谱仪：配备自动进样器、在线脱气机、自动柱温箱、二极管阵列检测器，Open-lab 工作站（美国安捷伦公司）；Sartorius GL623i-1SCN 型电子天平（德国赛多利斯公司）；KQ-5000D 型超声波清洗机（昆山市超声仪器有限公司）；Milli-Q Advantage A10 型超纯水器（美国密理博公司）。

1.2 试剂与试剂

蛇床子素（批号 110822-201710，质量分数以 99.5%计）、苍术素（批号 111924-201806，质量分数以 99.5%计）、盐酸小檗碱（批号 110713-201814，质量分数以 86.7%计）对照品均购自中国食品药品检定研究院；乌蛇止痒丸（广州白云山中一药业有限公司，规格每 10 丸重 1.25 g，批号 20190813、20191121、20191215）；乙腈、甲醇均为色谱纯（美国 Tidea 公司）；实验用水为超纯水（自制）；其他试剂均为分析纯（国药集团上海化学试剂厂）。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Waters Acquity Beh C₁₈ 色谱柱(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm)；检测器：DAD 检测器；流动相为乙腈(A) - 0.1%磷酸溶液（取 1.0 mL 磷酸，加纯化水定容至 1000 mL），梯度洗脱（0~4 min, 22% A；4~11 min, 22%~63% A；11~17 min, 63%~91% A；17~19 min, 91%~22% A；19~24 min, 22% A）；检测波长：331 nm；体积流量：1.0 mL/min；柱温：30 ℃；进样体积：25 μL。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品储备溶液的制备 取盐酸小檗碱、苍术素、蛇床子素对照品，精密称定，置 50 mL 量瓶中，加 90%甲醇至刻度，摇匀，即得（含盐酸小檗碱、苍术素、蛇床子素 447.7、199.0、433.5 μg/mL）。

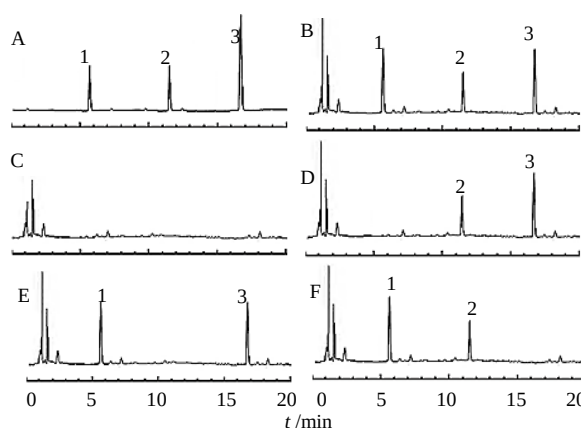
2.2.2 对照品溶液的制备 取对照品储备溶液，精密吸取 1.0 mL，置 10 mL 量瓶中，加 90%甲醇至刻度，摇匀，即得（含盐酸小檗碱、苍术素和蛇床子素 44.77、19.90、43.35 μg/mL）。

2.2.3 供试品溶液的制备 取乌蛇止痒丸样品 20 粒，研细，取约 1.0 g，精密称定，置 50 mL 量瓶中，加 90%甲醇约 40 mL，超声提取 25 min（超声功率 250 W、频率 50 kHz），取出放冷，加 90%甲醇至刻度，摇匀，0.22 μm 滤膜滤过，取续滤液，即得。

2.2.4 阴性对照溶液的制备 按乌蛇止痒丸药材配比和制备工艺方法分别制备缺关黄柏、苍术和蛇床子的阴性对照样品，按供试品溶液的制备项下方法进行处理，制得阴性对照溶液。

2.3 专属性试验

分别取对照品储备溶液、供试品溶液和阴性对照溶液，分别进样分析，记录色谱图。结果盐酸小檗碱、苍术素和蛇床子素分离良好，且阴性对照溶液色谱图无干扰峰存在，方法专属性良好。色谱图见图 1。



1-盐酸小檗碱 2-苍术素 3-蛇床子素
1-berberine hydrochloride 2-atractylodin 3-osthole

图 1 对照品溶液(A)、供试品溶液(B)、缺关黄柏、苍术和蛇床子的阴性对照(C)、缺关黄柏的阴性对照(D)、缺苍术的阴性对照(E)、缺蛇床子的阴性对照(F)的 HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC chromatograms of reference solution (A), sample solution (B), negative sample without *Phellodendri Amurensis Cortex*, *Atractylodis Rhizoma*, and *Cnidii Fructus* (C), negative sample without *Phellodendri Amurensis Cortex* (D), negative sample without *Atractylodis Rhizoma* (E), and negative sample without *Cnidii Fructus* (F)

2.4 线性关系的考察

取对照品储备溶液，分别精密吸取适量，制备含盐酸小檗碱、苍术素和蛇床子素的系列对照品溶液（含盐酸小檗碱 8.954、17.908、44.770、89.540、179.080、447.700 μg/mL，含苍术素 3.980、7.960、19.900、39.800、79.600、199.000 μg/mL，含蛇床子素 8.670、17.340、43.350、86.700、173.400、433.500 μg/mL），分别进样分析，记录色谱图；以质量浓度为横坐标，峰面积积分值为纵坐标进行曲线方程计算。结果见表 1。

表1 3种活性成分的曲线方程、相关系数和线性范围

Table 1 Curve equation, correlation coefficient, and linear range of three active components

成分	曲线方程	<i>r</i>	线性范围/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
盐酸小檗碱	$Y=582.088X+48.627$	0.999 3	8.954~447.700
苍术素	$Y=304.496X+221.591$	0.999 1	3.980~199.000
蛇床子素	$Y=386.252X+448.294$	0.999 6	8.670~433.500

2.5 精密性试验

取对照品储备溶液,精密吸取 5.0 mL,置 50 mL 量瓶中,加 90%甲醇至刻度,摇匀;连续进样 6 次,记录色谱图,结果盐酸小檗碱、苍术素和蛇床子素峰面积的 RSD 值分别为 1.2%、1.4%、0.6%。

2.6 稳定性试验

取乌蛇止痒丸(批号 20190813)样品适量,制备供试品溶液,分别于室温下放置 0、2、4、8、12、24 h 后取样,分别进样分析,记录色谱图,结果盐酸小檗碱、苍术素和蛇床子素峰面积 RSD 值分别为 1.3%、1.5%、0.9%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.7 重复性试验

取同一批乌蛇止痒丸(批号 20190813)样品 6 份,制备供试品溶液,分别进样分析,记录色谱图,以峰面积计算 3 种活性成分的质量分数。结果盐酸小檗碱、苍术素和蛇床子素质量分数的 RSD 值分别为 2.1%、1.9%、1.4%。

2.8 回收率试验

取乌蛇止痒丸(批号 20190813)样品 20 粒,研细,取约 1.0 g,共称取 6 份,精密称定,置 50 mL 量瓶中,分别加入各成分对照品溶液适量(含盐酸小檗碱、苍术素、蛇床子素分别为 0.890 2、0.374 3、0.258 2 mg),制备供试品溶液,分别进样分析,记录色谱图,计算盐酸小檗碱、苍术素和蛇床子素回收率。结果盐酸小檗碱、苍术素、蛇床子素平均回收率分别为 99.69%、98.78%、99.38%,RSD 值分别为 1.9%、1.6%、1.5%。

2.9 样品测定

取乌蛇止痒丸样品,制备供试品溶液,再取盐酸小檗碱、苍术素和蛇床子素的对照品溶液,分别进样分析,记录色谱图。以盐酸小檗碱、苍术素和蛇床子素对照品溶液峰面积和乌蛇止痒丸供试品中 3 种成分峰面积采用外标法计算乌蛇止痒丸供试品中盐酸小檗碱、苍术素和蛇床子素的质量分数。结果见表 2

表2 乌蛇止痒丸中蛇床子素、苍术素和盐酸小檗碱的测定结果($n=3$)Table 2 Results of osthol, atractylodin, and berberine hydrochloride in Wushe Zhiyang Pills ($n=3$)

批号	质量分数/($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)		
	盐酸小檗碱	苍术素	蛇床子素
20190813	0.900 7	0.385 8	1.287 5
20191121	0.879 2	0.390 8	1.154 9
20191215	0.921 4	0.402 5	1.172 3

3 讨论

3.1 检测波长的选择

取盐酸小檗碱对照品,加 90%甲醇制成含盐酸小檗碱 44.77 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的波长测试溶液,同法制备含苍术素 19.90 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、蛇床子素 43.35 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的波长测试溶液;取上述 3 种波长测试溶液,设定在紫外波长 190~400 nm 进行全波段扫描,记录光谱图。结果盐酸小檗碱、苍术素和蛇床子素分别在 344、340、323 nm 处有最大吸收,3 种活性成分最大吸收波长接近,实验最终确定 331 nm 作为检测波长。实验证明,选择该波长时,3 种活性成分无基质干扰,且定性、定量结果准确。

3.2 流动相体系的选择

选择合适的流动相体系对检测效率的提高、待测组分分离影响和定性、定量结果具有重要的影响。实验选择 4 种高效液相色谱常用的流动相体系:甲醇-水、甲醇-0.1%磷酸溶液、乙腈-水和乙腈-0.1%磷酸溶液,进样测定,考察 4 种流动相体系对盐酸小檗碱、苍术素和蛇床子素检测的影响。结果,选择乙腈-0.1%磷酸溶液流动相体系时,3 种活性成分分析时间短、分离效果最佳,且定性定量结果准确。

3.3 前处理条件的优化

乌蛇止痒丸系由乌梢蛇、蛇床子、关黄柏、苍术等 11 味中药材组成,药味较多,基质复杂,因此前处理条件的选择,对于提高检测效率、降低基质

干扰等具有重要的作用。取乌蛇止痒丸样品(批号20190813),分别选择提取溶剂甲醇、90%甲醇溶液、80%甲醇溶液和70%甲醇溶液,考察对提取效果的影响,结果选择90%甲醇作为提取剂时,基质无干扰,且3种成分提取效果最佳;确定提取溶剂后,再分别考察超声功率(200、250、300 W)、时间(15、20、25、30 min)的影响,最终确定最佳的提取条件为:90%甲醇溶液作为提取溶剂,超声功率控制250 W,时间控制25 min。

综上所述,实验研究建立快速测定乌蛇止痒丸中盐酸小檗碱、苍术素和蛇床子素的UPLC方法,考察了方法的回收率、重复性、稳定性试验等参数,优化了检测波长、流动相体系和提取条件,结果表明,此方法具有快速、准确、简便等特点,为进一步提高乌蛇止痒丸的质量控制提供技术参考。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] 商婷,张燕.复方甘草酸苷片联合乌蛇止痒丸治疗慢性荨麻疹临床观察[J].中国中西医结合皮肤性

病学杂志,2012,11(4):251-252.

- [2] 马文辉,邱木雄.咪唑斯汀联合乌蛇止痒丸治疗慢性特发性荨麻疹的疗效观察[J].现代中西医结合杂志,2010,19(6):682-683.
- [3] 牛国莲.乌蛇止痒丸新用途[J].家庭中医药,2010,17(5):51.
- [4] 王蔚,颜玉贞.RP-HPLC法测定乌蛇止痒丸中小檗碱含量[J].中草药,2001,32(5):417-418.
- [5] 郑晓晴,王蔚,谭燕梨,等.乌蛇止痒丸的质量控制方法[P].中国:CN100425986C,2008-10-15.
- [6] 中国药典[S].一部.2015:699-700.
- [7] 徐洪胜,彭振宇.四子填精胶囊中蛇床子素的含量[J].中西医结合心血管病电子杂志,2019,7(7):33-34.
- [8] 孙华.HPLC法测定金蝉止痒胶囊中蛇床子素含量的研究[J].中国处方药,2019,17(11):12-14.
- [9] 杨立志,姜雪敏.高效液相色谱法测定藿香正气水中苍术素含量[J].中国药业,2016,25(16):70-72.
- [10] 朱云.HPLC法同时测定消炎止痛洗剂中大黄酚和盐酸小檗碱的含量[J].中国处方药,2019,17(7):48-49.
- [11] 张莹莹,季巧遇,李诒光,等.HPLC法同时测定半夏泻心汤标准煎液中黄芩苷和盐酸小檗碱含量[J].亚太传统医药,2019,15(2):68-71.

[责任编辑 解学星]