

伤科黄水制备工艺的优化

李怀国， 郑芳昊， 陈韵姿， 李子鸿， 刘东文， 刘效仿*
(佛山市中医院, 广东 佛山 528000)

摘要: **目的** 优化伤科黄水制备工艺。**方法** 以初次加水量、浸泡时间、提取时间、二次加水量为影响因素, 盐酸小檗碱转移率为评价指标, 正交试验优化制备工艺。**结果** 最佳条件为第 1 次加 12 倍量水浸泡 1 h 后提取 1.5 h, 第 2 次加 12 倍量水, 盐酸小檗碱转移率 53.10%。**结论** 该方法稳定可靠, 可用于制备伤科黄水。

关键词: 伤科黄水; 制备; 正交试验

中图分类号: R944 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1528(2018)09-1969-04

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2018.09.015

Preparation optimization for Shangke Huangshui

LI Huai-guo, ZHENG Fang-hao, CHEN Yun-zi, LI Zi-hong, LIU Dong-wen, LIU Xiao-fang*
(Foshan Hospital of TCM, Foshan 528000, China)

KEY WORDS: Shangke Huangshui; preparation; orthogonal test

伤科黄水是佛山市中医院院内制剂, 由黄连、黄柏等 6 味药材组成, 具有抗炎消肿、活血化瘀、祛腐生新功效, 临床上主要用于治疗跌打损伤、软组织、骨骼损伤等^[1-3]。由于治疗骨伤时大多采用外敷方式, 可迅速缓解症状, 起到消炎止痛的作用, 故选择性质稳定、制备简便、使用灵活的洗剂作为伤科黄水剂型。目前, 伤科黄水制备工艺以水提为主, 涉及溶剂量、浸泡时间、提取时间等多个影响因素, 但由于缺乏指标成分, 一直以来都未进行深入研究, 故本实验将选择盐酸小檗碱转移率作为评价指标来优化该方制备工艺。

1 材料

1.1 试药 伤科黄水 (批号 1721506、1721614、1721724), 由佛山市中医院自制。盐酸小檗碱对照品 (批号 110713-201212), 购自中国食品药品检定研究院。乙腈为色谱纯; 其他试剂均为分析纯。

1.2 仪器 Waters 2695 高效液相色谱仪, 配置在线脱气机、四元泵、2487 紫外检测器、柱温箱、

Empower 2 化学工作站 (美国 Waters 公司); KQ-300DE 数控超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司)。

2 方法和结果

2.1 溶液制备

2.1.1 供试品溶液 精密吸取伤科黄水 5.0 mL, 置于 100 mL 量瓶中, 加流动相适量, 超声 (250 W、40 kHz) 40 min, 放冷, 流动相稀释至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 即得。

2.1.2 对照品溶液 精密称取盐酸小檗碱对照品适量, 加甲醇制备每 1 mL 含 90.5 μg 该成分的溶液, 即得。

2.2 HPLC 法测定盐酸小檗碱含量

2.2.1 色谱条件 Welch Ultimate® XB-C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相 乙腈-0.05 mol/L 磷酸二氢钾 (50 : 50) (每 100 mL 加入 0.4 g 十二烷基硫酸钠, 磷酸调 pH 至 4.0); 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 25 ℃; 检测波长 345 nm。

收稿日期: 2017-11-16

基金项目: 广东省中医药局 2015 年度中医药强省专项资金-医院中药制剂开发项目 (2015); 广东省中医药局面上项目 (20171260, 20181249); 2016 年佛山市医学类科技攻关项目 (2016AB002041)

作者简介: 李怀国 (1970—), 男, 副主任药师, 从事中药新药研究。Tel: (0757) 81092310-6028, E-mail: 530437860@qq.com

* 通信作者: 刘效仿 (1964—), 男, 硕士, 主任医师, 从事中医骨伤及中药新药研究。Tel: (0757) 81092310-6028, E-mail: liuxf@163.com

2.2.2 专属性试验 精密吸取对照品、供试品、不含盐酸小檗碱的阴性供试品溶液各 10 μL，在“2.2.1”项色谱条件下进样测定，结果见图 1。由图可知，供试品在对照品保留时间处有相应色谱峰，并且峰型良好，与其他峰分离度大于 1.5，理论塔板数不小于 5 000，阴性无干扰，表明该方法专属性良好。

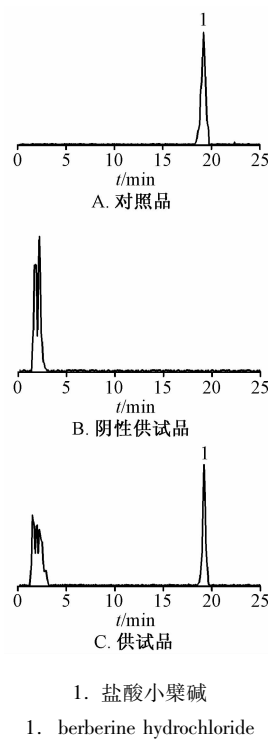


图 1 盐酸小檗碱 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of berberine hydrochloride

2.2.3 线性关系考察 精密称取盐酸小檗碱对照品适量，置于 50 mL 量瓶中，甲醇定容至刻度，摇匀，制备每 1 mL 含 461.591 μg 该成分的贮备液，精密吸取 2 mL，置于 50、20、10、5 mL 量瓶中；精密吸取 3 mL，置于 50、5 mL 量瓶中，甲醇定容至刻度，摇匀，制得 18.464、27.695、46.159、92.318、184.636、276.954 μg/mL 溶液。精密吸取上述溶液各 10 μL，在“2.2.1”项色谱条件下进样测定，以进样量为横坐标 (X)，峰面积为纵坐标 (Y) 进行回归，得回归方程为 $Y = 44\,584X + 8\,760$ ($r = 0.999\,98$)，在 18.464 ~ 461.591 μg/mL 范围内线性关系良好。

2.2.4 精密度试验 精密吸取对照品溶液 10 μL，在“2.2.1”项色谱条件下进样测定 6 次，测得盐酸小檗碱峰面积 RSD 为 0.3%，表明仪器精密度良好。

2.2.5 重复性试验 取同一批伤科黄水 (批号 1970

1721506)，按“2.1”项下方法制备 6 份供试品溶液，在“2.2.1”项色谱条件下进样测定，测得盐酸小檗碱含量 RSD 为 0.6%，表明该方法重复性良好。

2.2.6 中间精密度试验 不同操作人员取同一批伤科黄水 (批号 1721506)，按“2.1”项下方法制备 6 份供试品溶液，在“2.2.1”项色谱条件下进样测定，测得盐酸小檗碱含量 RSD 为 2.0%，表明该方法中间精密度良好。

2.2.7 稳定性试验 取“2.2.5”项下供试品溶液，于 0、2、4、8、14、20、24、36、44、48 h 在“2.2.1”项色谱条件下进样测定，测得盐酸小檗碱峰面积 RSD 为 0.8%，表明溶液在 48 h 内稳定性良好。

2.2.8 准确度试验 取盐酸小檗碱含量已知 (2.0 mg/mL) 的伤科黄水 6 份，每份 3 mL，置于 100 mL 量瓶中，精密加入 2 mL 贮备液 (1.839 mg/mL) 和适量流动相，超声 (250 W、40 kHz) 40 min，放冷，流动相稀释至刻度，摇匀，滤过，取续滤液，0.45 μm 微孔滤膜过滤，在“2.2.1”项色谱条件下进样测定。结果，盐酸小檗碱平均加样回收率为 99.5%，RSD 为 2.2%，表明该方法准确度良好。

2.2.9 样品含量测定 取 2 批伤科黄水 (批号 1721614、1721724) 各 3 份，按“2.1”项下方法分别制备 6 份供试品溶液，在“2.2.1”项色谱条件下进样测定，计算含量，结果见表 1。

表 1 盐酸小檗碱含量测定结果 (n=3)

Tab. 1 Results of content determination of berberine hydrochloride (n=3)		
批次	盐酸小檗碱/(mg·mL ⁻¹)	平均值/(mg·mL ⁻¹)
1721614	2.04	2.0
	1.99	
	1.98	
1721724	1.98	2.0
	1.95	
	1.94	

2.3 正交试验优化 按照配方比例称取药材，加水浸泡后连续煎煮 2 次，合并煎液，浓缩至规定浓度，以盐酸小檗碱转移率为评价指标 (Y)，公式如下。

小檗碱转移率 = $\frac{\text{提取液中的含量}}{\text{投入药材总含量}} \times 100\%$

然后，采用 L₉(3⁴) 正交试验表，考察初次加水量 (A)、浸泡时间 (B)、提取时间 (C)、二次加水量 (D) 对盐酸小檗碱转移率的影响。因素水

平见表2，结果见表3。

表 2 因素水平				
Tab. 2 Factors and levels				
水平	因素			
	A 初次加水 量/倍	B 浸泡时 间/h	C 提取时 间/h	D 二次加 水量/倍
1	8	0.5	1.0	8
2	10	1.0	1.5	10
3	12	1.5	2.0	12

表 3 试验设计及结果					
Tab. 3 Design and results of tests					
试验号	A 初次加 水量/倍	B 浸泡时 间/h	C 提取时 间/h	D 二次加 水量/倍	Y 盐酸小檗 碱转移率/%
1	8	0.5	1.0	8	46.85
2	8	1.0	1.5	10	48.55
3	8	1.5	2.0	12	48.56
4	10	0.5	1.5	12	53.45
5	10	1.0	2.0	8	52.29
6	10	1.5	1.0	10	50.97
7	12	0.5	2.0	10	52.29
8	12	1.0	1.0	12	53.20
9	12	1.5	1.5	8	53.13
均值 1	47.99	50.86	50.34	50.75	—
均值 2	52.24	51.35	51.71	50.60	—
均值 3	52.87	50.89	51.05	51.74	—
极差	4.89	0.48	1.37	1.14	—

由表3可知，各因素影响程度依次为初次加水量>提取时间>二次加水量>浸泡时间。方差分析（表4）显示，初次加水量有显著影响（ $P<0.05$ ），其余因素无显著影响（ $P>0.05$ ）。由此可知，最优工艺为第1次加12倍量水浸泡1h后提取1.5h，第2次加12倍量水，盐酸小檗碱转移率在45%以上。

表 4 方差分析				
Tab. 4 Analysis of variance				
来源	偏差平方和	自由度	F 值	P 值
A	42.36	2	94.54	<0.05
B	0.45	2	1.00	>0.05
C	2.82	2	6.29	>0.05
D	2.30	2	5.13	>0.05
误差	0.45	2	—	—

注： $F_{0.05}(2,2)=19.00$

2.4 验证试验 取同一批药材，分别采用优化前（第1次加8倍量水浸泡过夜后提取1.5h，第2次加8倍量水）、优化后（第1次加12倍量水浸泡1.0h后提取1.5h，第2次加12倍量水）工艺制备6批伤科黄水，按上述方法测定盐酸小檗碱含量，结果见表5。由表可知，优化后该成分含量与优化前相比显著提高（ $P<0.05$ ），转移率为53.10%。

表 5 验证试验结果 ($\bar{x} \pm s, n=6$)		
Tab. 5 Results of verification tests ($\bar{x} \pm s, n=6$)		
时间	盐酸小檗碱/(mg·mL ⁻¹)	平均值/(mg·mL ⁻¹)
优化前	2.01	2.00 ± 0.02
	1.97	
	1.98	
	2.02	
	2.03	
	1.99	
优化后	2.48	2.53 ± 0.04 *
	2.51	
	2.55	
	2.49	
	2.60	
	2.54	

注：与优化前比较，* $P<0.05$

3 讨论

伤科黄水在佛山市中医院已有50余年的应用历史，临床疗效显著^[4-9]，但目前其质量标准仍以定性鉴别为主，缺乏定量测定。方中黄连为君药，辅以黄柏增强清热解毒、燥湿消肿之功，两者主要有效成分均为生物碱，其中盐酸小檗碱含量最高，活性较强^[10-18]，故本实验选择其作为指标成分。

限于技术条件及专业人才不足，伤科黄水提取工艺相对粗放，虽然采用2次提取，但对关键工艺参数主要还是依靠往常经验来确定。例如，将加水量设定为8倍，认为煎煮、浸泡时间越长，提取效果越好，并将样品放置过夜；由于缺乏合适的量化评价指标，故仅从制剂性状（如颜色、澄明度等）角度来判断工艺质量，导致在临床实践中经常有患者反映疗效不够稳定。

本实验以盐酸小檗碱转移率为评价指标，通过正交试验优化初次加水量、浸泡时间、提取时间、二次加水量等因素，发现初次加水量影响程度最显著，盐酸小檗碱转移率在8~12倍范围内呈递增趋势，这可能是因为在浸泡阶段一部分水被药材吸收，8倍加水量不足以形成较大浓度差，使得该成分难以从黄连、黄柏等药材中充分溶出，故将其提高至12倍；提取时间虽然对盐酸小檗碱转移率也有一定影响，但在1~2h范围内并不显著，从生产实际角度考虑，选择1.5h比较合理；浸泡时间在0.5~1.5h范围内也无显著影响，表明原提取工艺中药材浸泡过夜没有必要，从节约时间和成本角度考虑，浸泡1.0h时已足以保证该成分充分溶出。

参考文献：

[1] 蔡 薇, 廖锡锵. 伤科黄水消除胫腓骨双骨折术前肿胀疗效观察[J]. 亚太传统医药, 2017, 13(2): 140-141.

[2] 潘海文, 王朝辉, 李卓伟, 等. 伤科黄水预防断指再植术后血管危象的临床观察[J]. 中成药, 2017, 39(5): 916-921.

[3] 罗学辉, 谢学文, 曾文磊, 等. 关节镜下有限清理术配合伤科黄水外敷治疗膝骨性关节炎的效果[J]. 广东医学, 2016, 37(7): 1078-1081.

[4] 宋苏闽, 黎 庆, 颜 玲. 伤科黄水对尺桡骨干双骨折手法复位后肿胀消除的作用研究[J]. 现代诊断与治疗, 2015, 26(13): 2897-2899.

[5] 蓝雪花, 覃丽容, 刘俭葵. 黄油纱配合黄水纱外敷治疗急性皮肤软组织挫擦伤的疗效观察[J]. 中医药导报, 2015, 21(16): 76-78.

[6] 顾卫红, 秦丽琴, 沈影超. 胫腓骨骨折围手术期伤科黄水外治护理观察[J]. 内蒙古中医药, 2012, 31(21): 157-158.

[7] 王应琼. 伤科黄水治疗急诊手外伤截指术后患者疗效观察[J]. 中国中医急症, 2009, 18(7): 1081, 1091.

[8] 黎庆卫. 不同剂量伤科黄水对减轻四肢骨折肿胀疼痛的疗效比较[J]. 岭南急诊医学杂志, 2009, 14(5): 417-418.

[9] 冯永庆, 顾 坤. 伤科黄水治疗急性软组织挫伤 100 例[J]. 现代医药卫生, 2005, 21(13): 1713.

[10] 孙宁阳, 张宏川, 顾 健, 等. 葛根黄连组分毒理学研究[J]. 中药药理与临床, 2017, 33(1): 95-98.

[11] 黎小斌, 邝 姮, 骆赞韵, 等. 黄连素干预多囊卵巢综合征患者胰岛素抵抗的临床观察[J]. 广州中医药大学学报, 2017, 34(2): 172-177.

[12] 张建锋, 刘 文, 侯晓杰, 等. 黄连超高液相色谱-质谱联用血清药物化学研究[J]. 时珍国医国药, 2017, 28(2): 284-285.

[13] 刘 洋, 隗 丽, 李雪莲, 等. 离体法及在体法对黄连水煎液中肠吸收多成分的初步研究[J]. 中国中药杂志, 2017, 42(8): 1551-1556.

[14] 岳 琳, 李 丽, 刘 颖, 等. 关黄柏炒炭前后饮片化学成分的变化规律分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(5): 7-11.

[15] 张 凡, 徐 珊, 刘蓬蓬, 等. 黄柏不同炮制品对甲亢型肾阴虚模型大鼠甲状腺和肾上腺皮质功能的影响[J]. 中国药房, 2017, 28(1): 27-30.

[16] 张宏伟, 王嘉琪, 张 婕, 等. 关黄柏醇提部位化学拆分组分分析及其对热证大鼠的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(10): 29-33.

[17] 李凌霄, 徐 俊, 王鹏华, 等. 复方黄柏液局部应用对糖尿病足溃疡愈合的临床研究[J]. 重庆医科大学学报, 2017, 42(3): 289-294.

[18] 孙振刚, 邱昆成, 李 丹, 等. UPLC-LTQ-Orbitrap XL 分析知母-黄柏药对化学成分[J]. 中药材, 2017, 40(1): 101-106.