DOI:10.13193/j.issn.1673-7717.2025.08.032

两种秋石制黄柏的化学成分差异比较

周悦[1],任文静[1],赵佳慧[1],葛修通[1],姜诗儒[1],陈洋[1],徐炅[1],张硕[1],张凡[1,2]
(1.辽宁中医药大学药学院,辽宁 大连 116600;2.辽宁省中药炮制工程技术研究中心,辽宁 大连 116600)

摘要:目的 比较咸秋石制黄柏与淡秋石制黄柏的化学成分差异及辅料中的化学成分差异。方法 采用高效液相色谱法测定黄柏中的绿原酸、黄柏碱、木兰花碱、盐酸药根碱、小檗红碱、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱、黄柏内酯、黄柏酮以及辅料中的尿酸含量,另采用络合滴定法测定辅料中氯化钠、氯化钙、不溶性钙盐含量。结果 黄柏原有成分中的绿原酸、黄柏碱、小檗红碱、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱含量,咸秋石制黄柏多于淡秋石制黄柏;辅料成分中的氯化钠、氯化钙含量,咸秋石制黄柏多于淡秋石制黄柏。结论 本研究含量测定方法简便可靠,稳定性好,可全面、有效地比较两种秋石制黄柏的化学成分差异。

关键词:黄柏;秋石;含量测定;高效液相色谱法;络合滴定法
中图分类号:R283.2 **文献标志码:**A **文章编号:**1673-7717(2025)08-0167-07

Comparison of Chemical Composition Differences between Huangbai(Phellodendri Chinensis Cortex) Processed with Xianqiushi(Sal Praeparatum) and Danqiushi(Depositum Urinae Praeparatum)

ZHOU Yue[1],REN Wenjing[1],ZHAO Jiahui[1],GE Xiutong[1],JIANG Shiru[1],CHEN Yang[1],XU Jiong[1],ZHANG Shuo[1],ZHANG Fan[1,2]
(1. School of Pharmacy,Liaoning University of Traditional Chinese Medicine,Dalian 116600,Liaoning,China;
2. Liaoning Engineering Technology Research Center of Traditional Chinese Medicine Processing,Dalian 116600,Liaoning,China)

Abstract:*Objective* This study aimed to compare the differences in chemical composition between Huangbai(Phellodendri Chinensis Cortex) processed with Xianqiushi(Sal Praeparatum) and Danqiushi(Depositum Urinae Praeparatum) and the difference of chemical composition in the auxiliary materials were compared. *Methods* High performance liquid chromatography (HPLC) was used to determine the contents of chlorogenic acid,phellodendrine,magnoflorine,jatrorrhizine hydrochloride,berberrubine,palmatine hydrochloride,berberine hydrochloride,obaculactone and obacunone in Huangbai(Phellodendri Chinensis Cortex),and uric acid in auxiliary material. The complexometric tritration method was used to determine the contents of sodium chloride,calcium chloride and insoluble calcium salt in auxiliary materials. *Results* The contents of chlorogenic acid,phellodendrine,berberrubine,palmatine hydrochloride and berberine hydrochloride in Huangbai(Phellodendri Chinensis Cortex) processed with Xianqiushi(Sal Praeparatum) was found to be higher than that processed with Danqiushi(Depositum Urinae Praeparatum). The contents of sodium chloride and calcium chloride in the ingredients of auxiliary materials,Huangbai(Phellodendri Chinensis Cortex) processed with Xianqiushi(Sal Praeparatum) was more than Huangbai(Phellodendri Chinensis Cortex) processed with Danqiushi(Depositum Urinae Praeparatum). *Conclusion* This simple yet reliable method provides a stable approach for comprehensively comparing the differences in chemical composition between two types of Huangbai(Phellodendri Chinensis Cortex) processed with Xianqiushi(Sal Praeparatum) and Danqiushi(Depositum Urinae Praeparatum).

Keywords: Huangbai(Phellodendri Chinensis Cortex);Qiushi(Sal Praeparatum/Depositum Urinae Praeparatum);content determination;high performance liquid chromatography;complexometric tritration

川黄柏为芸香科植物黄皮树 *Phellodendron chinense* Schneid.的干燥树皮,具有清热燥湿、泻火除蒸、解毒疗疮的功效,可用于治疗湿热泻痢、骨蒸劳热、盗汗遗精等症状[1]。川黄柏含有多种化学成分,包括生物碱类、柠檬苦素类、黄酮类、酚酸类等[2-3]。其中生物碱类成分被认为是主要化学成分,具有抗炎、镇痛等药理作用[4]。黄柏的炮制方法有多种,如盐炙黄柏、酒炙黄柏等,盐黄柏为黄柏当前主流炮制品,用辅料秋石炮制黄柏虽早在《修事指南》一书中有所提及,但相关研究少见报道,本文以秋石炮制黄柏作为研究,比较其化学成分差异。

药用秋石分为两种商品来源,即咸秋石与淡秋石。其中咸秋石为食盐的加工品,主产于安徽桐城,为药用秋石的主流品种[5];淡秋石为人中白的加工品,主产于华东地区,在药材市

基金项目:国家中医药管理局中药炮制传承创新项目(国中医药科技函〔2023〕19号)
作者简介:周悦(1999-),女,山东济宁人,硕士在读,研究方向:中药炮制学。
通讯作者:张凡(1985-),男(回族),辽宁沈阳人,副教授,硕士研究生导师,博士,研究方向:中药炮制学。E-mail:zhangfan11123@163.com。

场上已经名存实亡[6]。秋石制黄柏的炮制见于清朝,在《医学从众录》与《妇科要旨》均有所记载,并在清代张仲岩的《修事指南》中提到了秋石制的炮制理论,即为“秋石制抑阳养阴”,指出中药黄柏通过秋石来炮制可以达到抑制相火,保护阴精,以达到滋阴降火的目的。

两种秋石来源不同,制备方法不同,其主含的化学成分也不尽相同。本研究通过高效液相色谱法测定黄柏中的绿原酸、生物碱类、柠檬苦素类和辅料中的尿酸含量,络合滴定法测定辅料中氯化钠、氯化钙、不溶性钙盐含量,比较两种秋石化学成分的差异,以期为秋石制黄柏质量标准的制定以及有关药效的研究提供数据支撑。

1 仪器和试剂

1.1 仪器

E2695 型高效液相色谱仪(美国 Waters 公司);XMTD - 8222 型电热恒温鼓风干燥箱、FA1004B 型万分之一电子天平(上海精宏试验设备有限公司);AE240 型十万分之一电子分析天平(瑞士梅特勒 - 托利多公司);KQ - 250E 型医用超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);纯水仪(美国 Millipore 公司)、pH 计(上海仪电科学仪器)。

1.2 试剂与药材

小檗红碱对照品(批号 A1107AS)、黄柏碱对照品(批号 M0107AS)、绿原酸对照品(批号 MB6178 - S)、黄柏内酯对照品(批号 M0606AS)、黄柏酮对照品(批号 F0102AS),尿酸对照品(批号 MB4226 - S)购自大连美仑生物科技有限公司;盐酸小檗碱对照品(批号 MUST - 16040702)、盐酸药根碱对照品(批号 MUST - 16040702)购自成都曼思特生物科技有限公司,木兰花碱对照品(批号 wkq16050801)购自四川省维克奇生物科技有限公司,盐酸巴马汀对照品(批号 151120)购自上海圻明生物科技有限公司,质量分数均≥98%;EDTA 滴定液(20230612A)购自泉州市易研堂科技有限公司;硝酸银滴定液(23S05X18)、铬酸钾指示剂(23S05X08)购自福州韦伯康生物科技有限公司,铬蓝黑 R 指示剂(C15331335)、羟基萘酚蓝指示剂(MKL - H810857)购自大连海晨贸易有限公司;乙腈、甲醇为色谱纯;醋酸、高氯酸、磷酸、磷酸二氢钾、氢氧化钠、氢氧化钾、二氯甲烷、石油醚为分析纯。

黄柏(批号 2302001)、咸秋石(批号 2211001)、白及(批号 2302003)、人中白(批号 2301001)均购自安国市聚药堂药业有限公司,黄柏经辽宁中医药大学中药鉴定室李峰教授鉴定为药典收载基源芸香科植物黄皮树(*Phellodendron chinense* Schneid.)的干燥树皮。

2 方法与结果

前期实验室以炒炙温度、炒炙时间、辅料使用量为考察因素,黄柏碱、小檗红碱、盐酸小檗碱与外观性状作为评价指标优选两种秋石制黄柏的炮制工艺。在此实验基础上,本研究取黄柏样品适量,按照最佳炮制工艺条件对黄柏进行炒炙,比较两种秋石制黄柏中的绿原酸、生物碱类、柠檬苦素类及其辅料中氯化钠、氯化钙、不溶性钙盐及尿酸含量。

2.1 咸秋石制黄柏、淡秋石制黄柏的制备

2.1.1 辅料的制备 辅料咸秋石水的制备:将咸秋石研成粉末,溶于水中,根据溶解情况,确定咸秋石与水的比例为 1∶13.3。

辅料淡秋石水的制备:取漂净晒干的人中白,研粉;白及浸泡于水中 24 h 制成白及浆水(1∶1),作为黏合剂使用;将人中白粉与白及浆水(3∶1)混合,放入模具中,晒干即得。将制备好的淡秋石研成粉末,溶于水中,根据溶解情况,确定淡秋石与水的比例为 1∶13.3。

2.1.2 黄柏及两种秋石制黄柏的制备 生黄柏的制备:取黄柏原药材,除去杂质,喷淋清水,润透,切丝,干燥。

咸秋石制黄柏的制备:取净黄柏丝 50 g,放入适宜的容器中,加咸秋石水 20 mL 拌匀,闷润 2 h 至药透汤尽后,置于炒制容器内,按照炒炙温度为 150 ~ 160 ℃,炒炙时间 5 min,咸秋石使用量为黄柏药材用量的 3%(1.5 g)的最佳炮制工艺条件炒炙,炒炙后取出,放凉后备用。

淡秋石制黄柏的制备:取净黄柏丝 50 g,放入适宜的容器中,加淡秋石水 20 mL 拌匀,闷润 2 h 至药透汤尽后,置于炒制容器内,按照炒炙温度为 150 ~ 160 ℃,炒炙时间 5 min,淡秋石使用量为黄柏药材用量的 3%(1.5 g)的最佳炮制工艺条件炒炙,炒炙后取出,放凉后备用。

2.2 标准溶液的制备

2.2.1 绿原酸、生物碱类对照品溶液的制备 分别精密称取适量绿原酸、黄柏碱、木兰花碱、盐酸药根碱、小檗红碱、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱对照品,分别置于 50 mL 容量瓶中,加甲醇溶解,稀释至刻度,制成质量浓度分别为 0.026 200、0.065 600、0.062 250、0.065 600、0.001 304、0.073 600、0.179 000 mg/mL 的对照品溶液。

2.2.2 柠檬苦素类对照品溶液的制备 分别精密称取黄柏内酯和黄柏酮对照品适量,加乙腈制成 0.066 200、0.012 300 mg/mL 的对照品溶液,摇匀,即得[7]。

2.2.3 尿酸对照品溶液的制备 精密称取尿酸对照品,置于 25 mL 容量瓶中,用 0.1 mol/L 的 NaOH 溶液 10 mL 溶解,再用 10% 甲醇溶液定容,得 0.006 300 mg/mL 的对照品溶液,摇匀,于 4 ℃下放置备用[8]。

2.3 供试品溶液的制备

2.3.1 测定黄柏中绿原酸、生物碱类成分供试品溶液的制备 精密称取咸秋石制黄柏、淡秋石制黄柏、生黄柏粉末各 0.5 g,加入 1% 醋酸 - 甲醇溶液 50 mL,称定质量,超声提取(功率 250 W,频率 40 kHz)40 min 后取出,放冷,用 1% 醋酸 - 甲醇补足失重,摇匀,滤过,取续滤液,即得[9]。

2.3.2 测定黄柏中柠檬苦素类成分供试品溶液的制备 精密称取咸秋石制黄柏、淡秋石制黄柏、生黄柏粉末各 1.0 g,分别置于索氏提取器中,用石油醚加热回流提取 3 h 后,弃去石油醚提取液,向残渣里加入二氯甲烷加热回流提取 5 h,滤过,浓缩,用乙腈转溶至 10 mL 容量瓶中,再用少量乙腈清洗滤渣及滤器 3 次,合并滤液,稀释至刻度,摇匀,即得[7]。

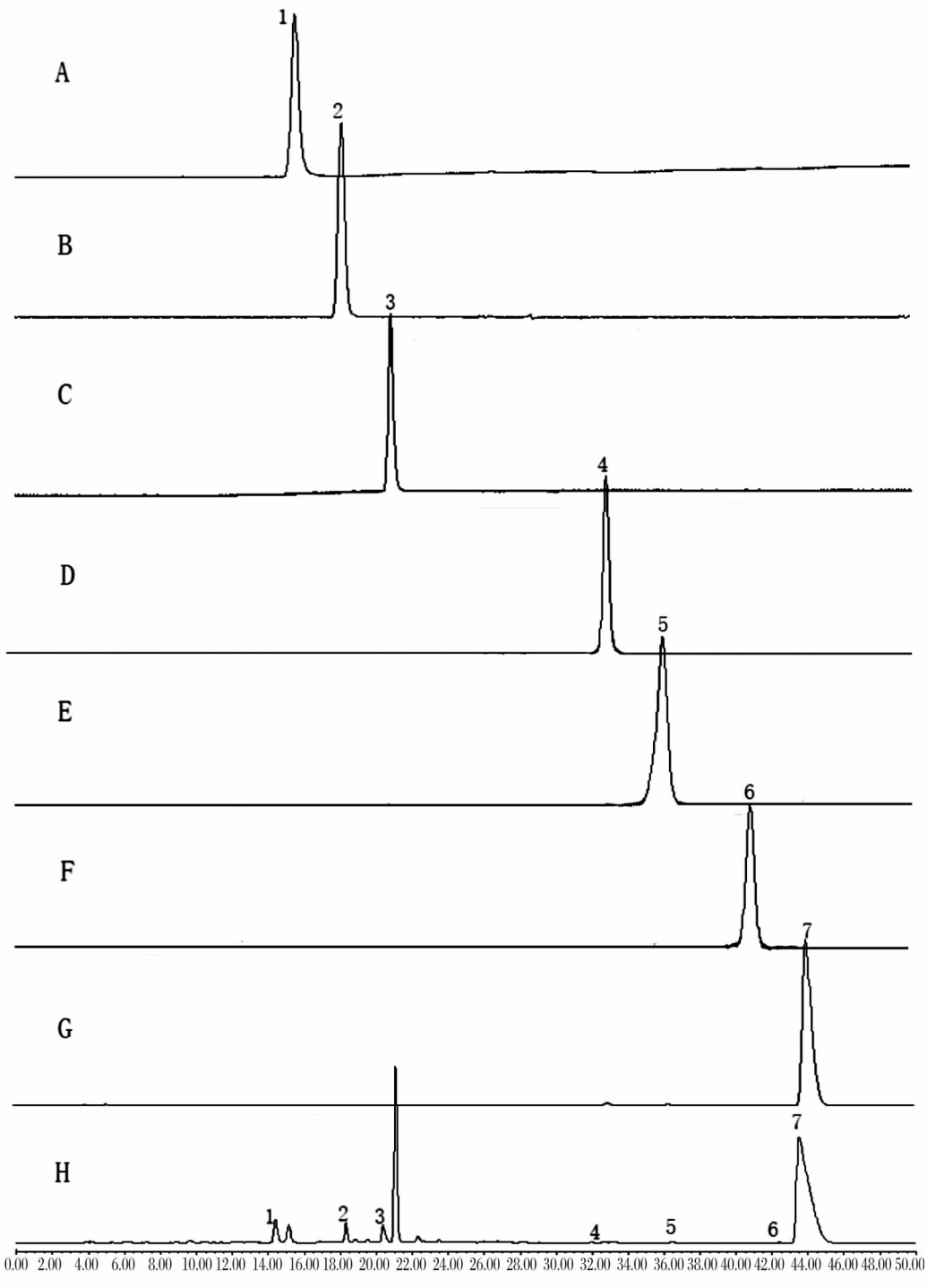
2.3.3 测定辅料中尿酸成分供试品溶液的制备 精密称取咸秋石制黄柏、淡秋石制黄柏、生黄柏、咸秋石与淡秋石各 1.0 g,加入 10% $HClO_4$ 6 mL,于 100 ℃沸水中水解 3 次,每次 1 h。每次水解完成后,用冰水立即冷却。取出置于离心机中离心(3000 r/min,30 min),取上清液,用 10 mol/L KOH 溶液调节上清液 pH 至 7.0,再用超纯水定容至 30 mL。浓缩上清液,用 0.1 mol/L H_3PO_4 溶液调节 pH 至 3.8,离心(3000 r/min,30 min),取上清液,过滤,将所得滤液定容至 10 mL,于 4 ℃下放

置备用[8]。

2.4 色谱条件及系统适应性试验

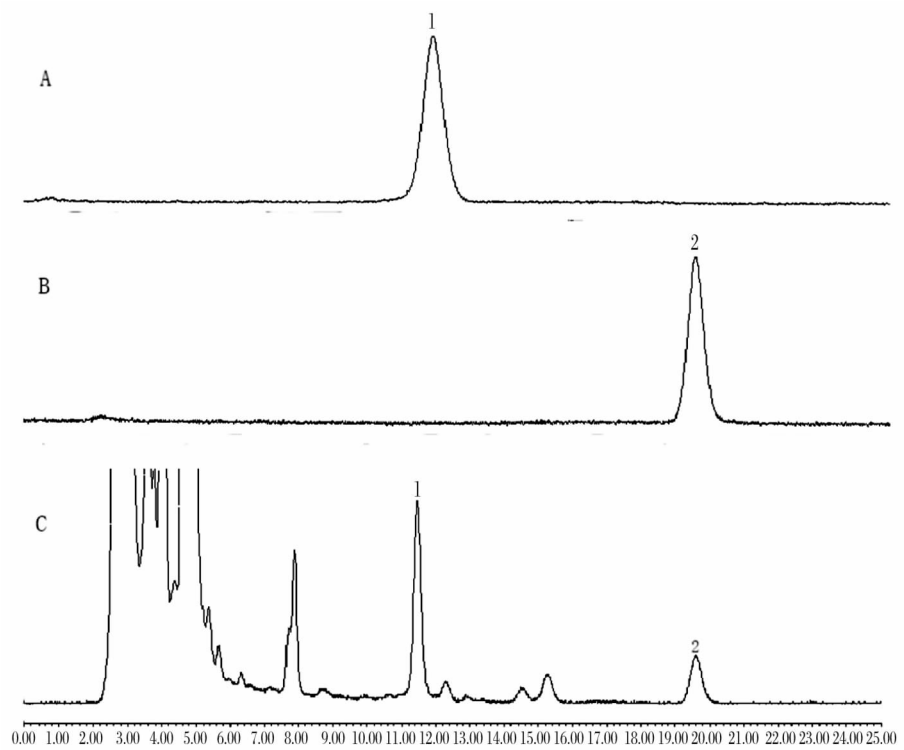
2.4.1 测定黄柏中绿原酸、生物碱类成分的色谱条件 色谱柱为 Ecosil C_{18} 色谱柱(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相为乙腈-水(含 0.3% 磷酸和 0.3% 磷酸二氢钾);梯度洗脱:0~10 min,10%~14% 乙腈;10~20 min,14%~25% 乙腈;20~45 min,25% 乙腈;45~50 min,25%~75% 乙腈。体积流量 0.8 mL/min,柱温 40 ℃;检测波长 284 nm;进样量为 5 μL[9]。色谱图见图 1。

2.4.2 测定黄柏中柠檬苦素类成分的色谱条件 色谱柱为 Ecosil C_{18} 色谱柱(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相为乙腈-水-磷酸(45∶55∶0.2),体积流量 1.0 mL/min,柱温 35 ℃,检



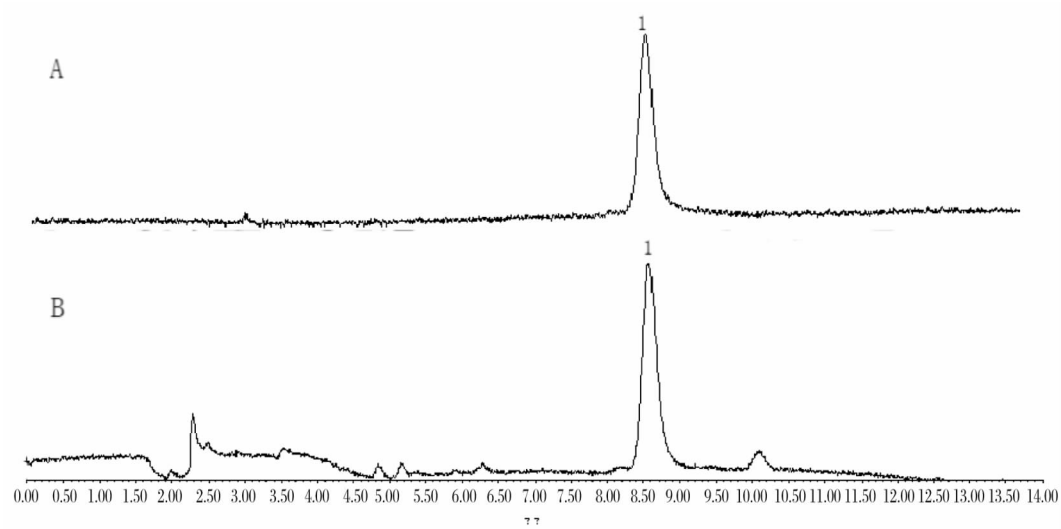
注:A 绿原酸对照品,B 黄柏碱对照品,C 木兰花碱对照品,D 盐酸药根碱对照品,E 小檗红碱对照品,F 盐酸巴马汀对照品,G 盐酸小檗碱对照品,H 供试品溶液;1-绿原酸,2-黄柏碱,3-木兰花碱,4-盐酸药根碱,5-小檗红碱,6-盐酸巴马汀,7-盐酸小檗碱。

图 1 黄柏中绿原酸、生物碱类成分色谱图



注:A 黄柏内酯对照品,B 黄柏酮对照品,C 供试品溶液;1 - 黄柏内酯,2 - 黄柏酮。

图2 黄柏中柠檬苦素类成分色谱图



注:A 尿酸对照品,B 供试品溶液; 1 - 尿酸。

图3 辅料中尿酸色谱图

测波长 210 nm,进样量为 10 μL[7]。色谱图见图 2。

2.4.3 测定辅料中尿酸的色谱条件 色谱柱为 Uitimate Polar RP(4.6 mm×250 mm,5μm),流动相为 0.005% 磷酸水溶液 - 甲醇(V∶V=97∶3),体积流量 1.0 mL/min,柱温 30 ℃,检测波长 254 nm,进样量 10 μL[8]。色谱图见图 3。

2.5 方法学考察

2.5.1 线性关系考察 取不同体积对照品溶液按“2.4.1”“2.4.2”“2.4.3”项下色谱条件进行测定,标准曲线以进样量(X)为横坐标,峰面积(Y)为纵坐标制备,如表 1 所示。

2.5.2 精密度考察 分别精密吸取“2.2.1”“2.2.2”“2.2.3”项下对照品溶液适量,连续进样 6 次,分别按“2.4.1”“2.4.2”“2.4.3”项下色谱条件测定,计算绿原酸、黄柏碱、木兰花碱、盐酸药根碱、小檗红碱、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱、黄柏内酯、黄柏酮、尿酸峰面积 RSD 值分别为 0.7%、0.9%、1.5%、1.5%、1.4%、1.3%、0.8%、1.1%、0.8%、0.8%,说明仪器精密度良好。

2.5.3 稳定性考察 分别精密吸取“2.3.1”“2.3.2”“2.3.3”项下供试品溶液适量,分别按“2.4.1”“2.4.2”“2.4.3”项下色谱条件分别在 0、1、2、4、8、12 h 测定,计算绿原酸、黄柏碱、木兰花碱、盐酸药根碱、小檗红碱、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱、黄柏

内酯、黄柏酮、尿酸峰面积 RSD 值分别为 2.0%、2.3%、1.1%、2.0%、1.2%、2.1%、0.2%、1.8%、1.2%、2.0%，说明对照品溶液在 12 h 内稳定。

表 1 对照品线性关系考察结果

成分	回归方程	R^2	线性范围/(μg)
绿原酸	Y = 2 543 591.041 5X + 179 123.238 8	0.999 0	0.046 7 ~ 0.583 8
黄柏碱	Y = 1 064 524.598 3X + 229 689.558 2	0.998 0	0.093 3 ~ 1.166 3
木兰花碱	Y = 1 030 889.291 9X + 90 006.483 6	0.998 5	0.106 1 ~ 1.326 3
盐酸药根碱	Y = 3 317 990.308 2X - 2 193.259 7	0.998 0	0.004 5 ~ 0.056 3
小檗红碱	Y = 3 325 155.009 4X - 373.194 0	0.999 7	0.053 2 ~ 0.664 7
盐酸巴马汀	Y = 3 732 626.666 7X - 18 687.900 0	0.998 9	0.003 0 ~ 0.037 9
盐酸小檗碱	Y = 4 334 016.359 5X - 92 221.080 6	1.000 0	0.399 5 ~ 4.993 3
黄柏内酯	Y = 691 703.869 5X + 8 556.949 3	0.999 9	0.108 5 ~ 1.356 3
黄柏酮	Y = 2 128 804.101 0X + 14 590.546 3	0.998 9	0.011 3 ~ 0.141 3
尿酸	Y = 1 055 441.887 1X - 2 677.764 2	0.999 2	0.001 0 ~ 0.012 5

2.5.4 重复性考察 分别精密称取供试品粉末按“2.3.1”“2.3.2”“2.3.3”项下方法平行制备供试品溶液 6 份，分别按“2.4.1”“2.4.2”“2.4.3”项下色谱条件进行测定，计算绿原酸、黄柏碱、木兰花碱、盐酸药根碱、小檗红碱、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱、黄柏内酯、黄柏酮、尿酸含量 RSD 值分别为 1.0%、1.9%、0.9%、1.3%、0.9%、2.2%、0.9%、1.3%、0.8%、1.9%，表明该方法重复性良好。

2.5.5 加样回收率考察 精密称取咸秋石制黄柏 0.5 g，精密加入对照品溶液适量，按“2.3.1”“2.3.2”项下方法平行制备 6 份供试品溶液，在“2.4.1”“2.4.2”项色谱条件下进样测定，计算回收率。结果，绿原酸、黄柏碱、木兰花碱、盐酸药根碱、小檗红碱、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱、黄柏内酯、黄柏酮加样回收率如表 2 所示。

表 2 咸秋石制黄柏各对照品加样回收率(n = 6)

成分	取样量/(g)	样品含量/(μg)	对照品加入量/(μg)	测定量/(μg)	回收率/(%)
绿原酸	0.501 3	0.001 5	0.002 0	0.003 6	104.05
	0.502 1	0.001 5	0.002 0	0.003 5	98.93
	0.501 9	0.001 5	0.002 0	0.003 6	103.96
	0.501 4	0.001 5	0.002 0	0.003 5	99.04
	0.502 9	0.001 5	0.002 0	0.003 6	103.81
	0.504 4	0.001 5	0.002 0	0.003 5	98.58
黄柏碱	0.500 6	0.002 7	0.003 0	0.005 8	102.06
	0.500 2	0.002 7	0.003 0	0.005 7	98.80
	0.502 2	0.002 7	0.003 0	0.005 6	95.10
	0.501 7	0.002 7	0.003 0	0.005 7	98.52
	0.501 9	0.002 7	0.003 0	0.005 7	98.49
	0.502 9	0.002 8	0.003 0	0.005 8	101.64
木兰花碱	0.501 1	0.004 7	0.005 0	0.009 6	98.29
	0.501 9	0.004 7	0.005 0	0.009 8	102.14
	0.502 2	0.004 7	0.005 0	0.009 5	96.09
	0.503 1	0.004 7	0.005 0	0.009 6	97.92
	0.502 3	0.004 7	0.005 0	0.009 8	102.07
	0.501 9	0.004 7	0.005 0	0.009 8	102.14
盐酸药根碱	0.505 1	0.000 1	0.000 1	0.000 24	103.62
	0.503 2	0.000 1	0.000 1	0.000 24	104.14
	0.500 0	0.000 1	0.000 1	0.000 23	95.00
	0.506 4	0.000 1	0.000 1	0.000 24	103.27
	0.504 8	0.000 1	0.000 1	0.000 24	103.70
	0.505 4	0.000 1	0.000 1	0.000 24	103.54
小檗红碱	0.503 3	0.001 9	0.002 0	0.004 0	104.62
	0.502 7	0.001 9	0.002 0	0.003 9	99.74
	0.501 1	0.001 9	0.002 0	0.003 8	95.04
	0.502 3	0.001 9	0.002 0	0.004 0	104.81
	0.502 1	0.001 9	0.002 0	0.003 9	99.85
	0.502 6	0.001 9	0.002 0	0.003 9	99.76
盐酸巴马汀	0.505 8	0.000 1	0.000 1	0.000 200	98.84
	0.503 5	0.000 1	0.000 1	0.000 200	99.30
	0.503 6	0.000 1	0.000 1	0.000 203	102.28
	0.504 7	0.000 1	0.000 1	0.000 200	99.06
	0.502 6	0.000 1	0.000 1	0.000 205	104.48
	0.503 3	0.000 1	0.000 1	0.000 2	99.34
盐酸小檗碱	0.501 8	0.024 7	0.020 0	0.044 7	99.88
	0.502 4	0.024 8	0.020 0	0.045 2	102.23
	0.501 4	0.024 7	0.020 0	0.045 1	101.98
	0.502 2	0.024 7	0.020 0	0.045 4	103.28
	0.500 9	0.024 7	0.020 0	0.044 8	100.60
	0.503 6	0.024 8	0.020 0	0.045 2	101.94
黄柏内酯	0.502 8	0.000 6	0.000 6	0.001 22	96.91
	0.500 2	0.000 6	0.000 6	0.001 24	100.79
	0.503 3	0.000 6	0.000 6	0.001 24	100.13
	0.502 7	0.000 6	0.000 6	0.001 22	96.93
	0.501 6	0.000 6	0.000 6	0.001 25	102.16
	0.503 9	0.000 6	0.000 6	0.001 23	98.34
黄柏酮	0.503 9	0.000 1	0.000 1	0.000 160	99.53
	0.501 4	0.000 1	0.000 1	0.000 160	99.83
	0.502 7	0.000 1	0.000 1	0.000 162	101.68
	0.501 8	0.000 1	0.000 1	0.000 164	103.78
	0.503 6	0.000 1	0.000 1	0.000 159	98.57
	0.501 8	0.000 1	0.000 1	0.000 160	99.78

2.6 络合滴定法测定辅料中氯化钠、氯化钙、不溶性钙盐的含量

络合滴定法测定样品中氯化钠、氯化钙、不溶性钙盐的含量。由于氯化钠与氯化钙均易溶于水，可以按照同样的方法提取。精密称取咸秋石制黄柏、淡秋石制黄柏、生黄柏、咸秋石与淡秋石样品各 5 g，加超纯水 200 mL，超声(功率 250 W，频率 40 kHz)20 min，混合均匀备用。

2.6.1 氯化钠含量测定 精密吸取样品溶液各 2 mL，置锥形瓶中，加超纯水 10 mL，摇匀，加铬酸钾指示液 1 mL，摇匀，分别用硝酸银滴定液(0.1 mol/L)滴定至溶液显淡红色为终点[10]。

2.6.2 氯化钙含量测定 精密吸取样品溶液各 2 mL，置锥形瓶中，加超纯水 10 mL，摇匀，加氢氧化钠试液 2 mL，铬蓝黑 R 指示剂少量，摇匀，用 EDTA 滴定液(0.05 mol/L)滴定至溶液由紫红色转变为纯蓝色为终点[11]。

2.6.3 不溶性钙盐含量测定 精密称取咸秋石制黄柏、淡秋石制黄柏、生黄柏、咸秋石与淡秋石粉末 0.15 g，加少量超纯水润湿试样，加 5 mL 稀盐酸溶液溶解，再小心加入 125 mL 超纯水，在不断搅拌下依次加入少量三乙醇胺和少量羟基萘酚蓝指示剂，用 EDTA 滴定液(0.05 mol/L)滴定少许，再滴加氢氧化钠溶液至最初的红色变成蓝色，继续滴加到蓝色变成紫色，再

过量 0.2 mL,继续用 EDTA 滴定液(0.05 mol/L)滴定至溶液出现澄清的蓝色,保持 60 s 不变。

2.7 样品含量测定

2.7.1 两种秋石制黄柏中绿原酸、生物碱类、柠檬苦素类成分含量测定 先精密称取咸秋石制黄柏、淡秋石制黄柏、生黄柏粉末各 0.5 g 测量绿原酸及生物碱类成分,再精密称取咸秋石制黄柏、淡秋石制黄柏、生黄柏粉末各 1 g 测量柠檬苦素类成分。按“2.3.1”“2.3.2”项下方法制备供试品溶液,并按“2.4.1”“2.4.2”项下色谱条件进样,计算各成分含量,如表 3 所示。

2.7.2 两种秋石制黄柏辅料中含量测定 精密称取辅料 1 g 测量尿酸成分,按“2.3.3”项下方法制备供试品溶液,并按“2.4.3”项下色谱条件进样,计算尿酸含量。辅料中其他成分按“2.6.1”“2.6.2”“2.6.3”项下方法制备溶液,分别用硝酸银滴定液(0.1 mol/L)、EDTA 滴定液(0.05 mol/L)滴定至终点颜色,计算相应含量。具体含量测定结果如表 3 所示。

3 讨论

近年来,关于中药药汁制后化学成分变化的研究逐渐增加。药汁制自从南齐出现后,一直发展至今,是中药炮制中极具特色的一部分[12]。药汁制中药时,药汁的加入方式多以拌为主,随后用浸、浸炒、文火煮等方法至药汁被饮片吸尽[13]。不同的炮制方法以及火力大小,对中药化学成分的影响极为关键[14]。在中药炮制过程中,常用到的液体辅料包括酒、蜜、醋、盐水、姜汁等[15],辅料酒制中药可以补肝肾,引药上行,蜜制中药温中补益等[16]。除以上常见的辅料外,药汁制中作为辅料的秋石分为两种,分别是淡秋石与咸秋石。淡秋石主产于华东地区,市场上近乎名存实亡;咸秋石主产于安徽桐城,目前是我国药用秋石的主流品种。据历代本草考察,宋、明、清时期药用秋石用的都是淡秋石,由于含有少量性激素成分,作为强壮药和壮阳药在宫廷和民间广泛使用。遗憾的是,古代这种淡秋石从清朝以后就湮没无闻了[17]。秋石入药治疗的疾病种类很广泛,随着炼制方法、用药经验、历史时期的不同,主治功效也有所区别。作为现代市场上药用秋石的主流咸秋石,其味咸、性寒、无毒,入肺、肾经,可以治疗虚劳、咳嗽咳血、骨蒸潮热、尿频遗精等疾病,但脾胃虚寒者忌用[18]。而当前黄柏炮制品种的主流为盐炙黄柏,黄柏经盐炙后可引药下行入肾,其滋肾阴、泻肾火、退虚热的功效增强,可用于阴虚发热、梦遗滑精、骨蒸劳热、盗汗、咳嗽咯血等证[19],基于以上理论依据,本研究通过比较两种秋石制黄柏的化学成分差异,为后续的药效研究提供理论基础。

现代学者对黄柏有效成分的研究多集中于生物碱类,并已证明其具有广泛的药理作用[20]。生物碱类成分主要有木兰花碱、黄柏碱、盐酸药根碱、小檗红碱、盐酸巴马汀和盐酸小檗碱等[21],其中盐酸小檗碱是黄柏中含量最高的生物碱类活性成分,具有抗炎[22]、抗菌[23]、降血糖[24]、降血压以及神经保护作用等[20,25]。小檗碱在生物体内转化为小檗红碱,发挥抗肿瘤作用[26]。除此以外,小檗红碱还有抗炎、抗菌、抗神经焦虑等作用[27-28]。柠檬苦素类化合物主要存在于芸香科植物和楝科植物中,是高度氧化的四环三萜类化合物[29-30],有抗肿瘤[31]、抗病毒[32]、抗氧化、抗肥胖等作用[33-34]。有文献研究,柠檬苦素类成分有抑制人胰腺 Panc-28 癌细胞生长,降低小鼠软骨细胞肿瘤坏死因子等作用[35]。绿原酸是一种苯丙素类物质,在中药杜仲与金银花中含量丰富,具有抗菌、抗炎等多种药理活性[36]。

本研究除了测定以上化学成分外,为了更为全面直观地比较两种秋石制黄柏在化学成分上的差异,还测定了辅料中的化学成分。氯化钠、氯化钙与不溶性钙盐选用络合滴定法进行测定,该方法很早就作为滴定金属离子的分析方法[37],反应速度快,操作简便[38]。尿酸的含量检测方法有多种,如高效液相色谱法、酶方法、荧光法等。其中色谱法操作简便,分离效果更好[39],故本文采用高效液相色谱法对其化学成分进行研究。由于测定尿酸所用的流动相为大比例水相,常规的 C_{18} 柱在高水流动相条件下易发生“疏水塌陷”,本文选用的色谱柱为亲水性色谱柱 Uitimate Polar RP,该填料亲水性基团和水相的兼容性较好,可以更好地分离化合物[40],由于尿酸在炮制品中的含量极少,本研究未进一步测其加样回收率。

本文按照最佳炮制工艺条件对黄柏进行炒炙,测定其化学成分。实验发现,两种秋石制黄柏中的绿原酸、黄柏碱、盐酸小檗碱含量均低于生黄柏,可能是随着温度的升高,化学成分发生了改变。咸秋石制黄柏中的绿原酸、黄柏碱、小檗红碱、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱含量均高于淡秋石制黄柏;盐酸药根碱、黄柏内酯含量虽与淡秋石制黄柏接近,但还是略高于淡秋石制黄柏。通过对辅料中化学成分测定,发现辅料咸秋石中含有氯化

表 3 各成分含量测定结果($n=3$,$\bar{x}\pm s$) 单位:%

分类	化学成分	咸秋石制黄柏	淡秋石制黄柏	生黄柏	咸秋石	淡秋石
黄柏中成分	绿原酸	0.32±0.01	0.30±0.02	0.45±0.05	—	—
	黄柏碱	0.51±0.04	0.49±0.03	0.54±0.02	—	—
	木兰花碱	0.99±0.06	1.08±0.04	0.95±0.14	—	—
	盐酸药根碱	0.03±0.00	0.03±0.00	0.03±0.00	—	—
	小檗红碱	0.38±0.01	0.28±0.01	0.01±0.00	—	—
	盐酸巴马汀	0.03±0.00	0.02±0.00	0.02±0.00	—	—
	盐酸小檗碱	4.94±0.10	4.93±0.14	5.46±0.42	—	—
	黄柏内酯含量	0.12±0.00	0.12±0.00	0.09±0.00	—	—
	黄柏酮含量	0.01±0.00	0.01±0.00	0.01±0.00	—	—
辅料中成分	氯化钠	0.78±0.14	0.25±0.05	0.49±0.08	35.03±0.17	0.92±0.10
	氯化钙	0.98±0.11	0.86±0.11	0.34±0.04	0.27±0.04	0.15±0.00
	不溶性钙盐	1.48±0.28	4.13±0.59	1.42±0.40	2.93±0.17	23.98±0.92
	尿酸	0.00±0.00	0.01±0.00	0.00±0.00	—	0.01±0.00

注:—表示未检测到该成分。

钠、氯化钙、不溶性钙盐等成分，但不含尿酸。将其与黄柏炒制后，氯化钠、不溶性钙盐含量均降低，氯化钙含量升高；辅料淡秋石主含不溶性钙盐；将两种辅料与黄柏炒制后，氯化钠含量、不溶性钙盐、尿酸含量均降低，氯化钙含量升高；生黄柏中与咸秋石制黄柏中的尿酸含量极少，可以忽略不计。由于水中本就含有钙离子，两种秋石制黄柏均是将黄柏润进咸（淡）秋石水里两个小时之后才去炒制，故两种秋石制黄柏中氯化钙含量会高于辅料咸秋石与淡秋石中氯化钙含量。

综上所述，本研究通过高效液相色谱法以及络合滴定实验法更为全面地比较两种秋石制黄柏的化学成分，由含量测定结果可知，两种秋石制黄柏在绿原酸、生物碱类成分以及柠檬苦素类成分以及辅料含量上存在差异，且咸秋石制黄柏中化学成分的含量整体要高于淡秋石制黄柏，可见咸秋石制黄柏要优于淡秋石制黄柏，对进一步有关滋肾阴的药效研究提供了科学依据，并为后续的质量标准的制定提供相应的理论支撑。

参考文献

[1] 代琪，胡宇，雷蕾，等. 黄柏炮制品的考证、化学成分和药理作用研究进展[J]. 亚太传统医药，2020，16(10)：205－208.
[2] 李先宽，冯杉，郑艳超，等. 黄柏与关黄柏的化学成分及生物活性研究进展[J]. 药物评价研究，2019，42(5)：1033－1037.
[3] 王荣. 川黄柏的化学成分及药理活性研究进展[J]. 临床合理用药杂志，2020，13(1)：173－174.
[4] 李敏，全云云，王婷，等. 川黄柏及其活性成分治疗痛风病作用研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志，2024，30(1)：286－298.
[5] 乔立新，熊芬霞. 水肿病人应慎用咸秋石[J]. 中国中药杂志，1991，16(10)：626.
[6] 汪小莉，景臣，刘芳园，等. 秋石的本草考证[J]. 安徽中医药大学学报，2023，42(5)：94－97.
[7] 张凡，吴琦，鞠成国，等. 产地加工炮制一体化与传统黄柏饮片的化学成分比较研究[J]. 中草药，2018，49(20)：4748－4752.
[8] 张静，杨平荣，王燕萍，等. 高效液相色谱法同时测定玫瑰花等多种食物中尿酸及4种嘌呤含量[J]. 兰州大学学报(医学版)，2019，45(3)：28－33.
[9] 刘蓬蓬，徐珊，张凡，等. 黄柏炮制前后生物碱和柠檬苦素类成分的变化研究[J]. 现代药物与临床，2015，30(1)：18－23.
[10] 刘春光，赵成梅，赵尚清. 银量滴定法测定复方甲氧沙林注射液中氯化钠的含量[J]. 解放军药学学报，2017，33(5)：451－452.
[11] 付晖，李想，韩蓓，等. 络合滴定法测定复方钾钙镁溶液中氯化钙含量的方法学验证与不确定度分析[J]. 中国医院用药评价与分析，2019，19(3)：331－333，339.
[12] 孙颖文，张婷，杨春梅，等. 中药药汁制法的现代研究进展[J]. 中国医药科学，2021，11(2)：25－29.
[13] 史辑，许枏，曹晖，等. 古今药汁制法演变及现代研究进展[J]. 中国药品标准，2023，24(3)：224－239.
[14] 李小霞，胡波林. 炮制与净制中药饮片的临床疗效及化学成分比较[J]. 临床合理用药，2024，17(4)：151－154.
[15] 万腾. 中药炮制中液体辅料炮制的发展衍变[J]. 世界最新医学信息文摘，2019，19(36)：173，177.
[16] 刘佳，郭锦晨，朋汤义. 陈嘉谟《本草蒙筌》辅料运用特色[J]. 河南中医，2023，43(4)：518－522.
[17] 王春松，方前波. 开发生产安徽道地药材淡秋石的建议[J]. 基层中药杂志，1996，10(3)：47－48.
[18] 容成. 秋季说秋石[J]. 家庭中医药，2015，22(10)：12－13.
[19] 张凡，孟莉，刘蓬蓬，等. 黄柏生品与盐炙品中生物碱类成分在大鼠肾组织脏器中的吸收差异[J]. 中成药，2020，42(11)：2954－2959.
[20] 徐亚莉，徐炯炯，张娟. HPLC法测定川黄柏不同炮制品中盐酸小檗碱的含量[J]. 中华中医药学刊，2021，39(10)：133－135.
[21] 冯媛，郭龙，常雅晴，等. 基于指纹图谱和多成分含量测定的关黄柏及川黄柏差异性研究[J]. 中草药，2022，53(16)：5179－5184.
[22] OCH A，PODGÓRSKI R，NOWAK R. Biological activity of berberine－a summary update[J]. Toxins (Basel)，2020，12(11)：713.
[23] BODIWALA H S，SABDE S，MITRA D，et al. Synthesis of 9－substituted derivatives of berberine as anti－HIV agents[J]. Eur J Med Chem，2011，46(4)：1045－1049.
[24] WANG K，FENG X C，CHAI L W，et al. The metabolism of berberine and its contribution to the pharmacological effects[J]. Drug Metab Rev，2017，49(2)：139－157.
[25] 余瑞莲，廖辉雄，陈海珍. 盐酸小檗碱对大鼠体内低剂量阿托伐他汀的药动学影响及机制研究[J]. 大医生，2022，7(20)：114－117.
[26] 齐飞，王国胜. 小檗红碱药理作用及其结构修饰研究进展[J]. 药学研究，2021，40(5)：324－328.
[27] 饶近秋，王凯，张婷婷，等. 小檗红碱及其衍生物的研究进展[J]. 中国药物化学杂志，2021，31(5)：369－377.
[28] 李杨松，王珑静，罗婕，等. 基于病证动物模型研究小檗红碱对小鼠口腔溃疡的作用及其机制[J]. 中药与临床，2023，14(3)：26－32.
[29] 张文琦，纪宏秀，吴倩，等. 柠檬苦素类化合物生物活性研究进展[J]. 安徽农学通报，2024，30(1)：21－26.
[30] 张群琳，何雅静，李甜，等. 柠檬苦素类化合物抗病原体作用及机制研究进展[J]. 天然产物研究与开发，2020，32(6)：1078－1085.
[31] CHANG L M，CHANG R X，SHEN J F，et al. Self－healing pectin/cellulose hydrogel loaded with limonin as TMEM16A inhibitor for lung adenocarcinoma treatment[J]. Int J Biol Macromol，2022，219：754－766.
[32] VALANSA A，TIETCHEU GALANI B R，DJAMEN CHUISSEU P D，et al. Natural limonoids protect mice from alcohol－induced liver injury[J]. J Basic Clin Physiol Pharmacol，2020，31(5)：/j/jbcpp.2020.31.issue－5/jbcpp－2019－0271/jbcpp－201.
[33] 李韶静，汤建华. 木果楝属柠檬苦素类似物及其生物活性的研究进展[J]. 中草药，2022，53(10)：3178－3194.
[34] 梁鑫富，董庆亮. 光谱法结合分子对接技术研究柠檬苦素与牛血清白蛋白的相互作用[J]. 食品工业科技，2024，45(21)：37－44.
[35] 查杨，张丰，周洁，等. 柠檬苦素抑制凋亡、促进自噬并通过PPARα促进脂肪酸氧化代谢改善非酒精性脂肪性肝病[J]. 药学学报，2023，58(8)：2402－2414.
[36] 李阳昱，李庆蓉，陈孝红，等. 绿原酸抗菌作用及机制的研究进展[J]. 中国抗生素杂志，2024，49(2)：141－150.
[37] 宋雪玲，王新霞. 中药龙齿含量的测定讨论[J]. 延安大学学报(医学科学版)，2011，9(2)：55，73.
[38] 王洋洋，刘庆旺，范振忠，等. 磷酸根离子检测的研究方法[J]. 化学工程师，2021，35(12)：57－60.
[39] 葛军营，郑颖，宋从从. 尿酸含量测定方法的研究进展[J]. 山东化工，2016，45(17)：65，68.
[40] 张静，蒋华军，刘仲华，等. 亲水性C_{18}硅胶反相色谱柱同时分离测定红茶中的有机酸[J]. 食品安全质量检测学报，2014，5(8)：2476－2481.