

四味穿心莲超微粉的薄层鉴别研究

王林¹,陈献忠¹,马霞²,王文佳²,张国祖^{2*}

(1. 河南省康星生物科技有限公司,河南焦作,454950;2. 河南牧业经济学院,河南郑州 450011)

[收稿日期] 2016-09-08 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2017) 02-0024-05 [中图分类号] S853.72

[摘要] 为控制四味穿心莲超微粉的质量,分别对其所含的四味药材进行薄层鉴别研究。通过穿心莲对照药材、穿心莲内脂和脱水穿心莲内脂的鉴别对穿心莲进行质量控制;通过靛玉红的鉴别对大青叶进行质量控制;通过芦丁的鉴别对葫芦茶进行质量控制;通过槲皮素的鉴别对辣蓼和葫芦茶进行质量控制。试验筛选并优化了相关提取方法和色谱条件,并分别制备对应的阴性样品溶液进行对比。结果表明,四种薄层鉴别方法均无阴性干扰,且简单、稳定,可以有效控制四味穿心莲超微粉的质量。

[关键词] 四味穿心莲超微粉;穿心莲;靛玉红;芦丁;槲皮素

Study on the TLC Identification of Siwei Chuanxinlian Ultra - Fine Powder

WANG Lin¹, CHEN Xian-zhong¹, MA Xia², WANG Wen-jia², ZHANG Guo-zu^{2*}

(1. Henan Kangxing Biotechnological Co., Ltd, Jiaozuo, Henan 454950, China;

2. Henan University of Animal Husbandry & Economy, Zhengzhou, Henan 450011, China)

Abstract: Four stable and reliable TLC methods were established to control the quality of four traditional Chinese medicine in Siwei Chuanxinlian ultra fine powder. The reference drug, andrographolide and dehydroandrographolide were identified for the quality control of andrographolide. The indirubin was identified for the quality control of foliumisatidis. The rutin was identified for the quality control of gourd tea. The quercetin was identified for the quality control of herba polygoni pubescentis and gourd tea. The correlative extraction method and TLC method were optimised and the negative samples were prepared for comparison. The results showed that the TLC methods had no negative interference, these methods were simple and stable, they can effectively control the quality of Siwei Chuanxinlian ultra fine powder.

Key words: Siwei Chuanxinlian ultra fine powder; andrographolide; indirubin; rutin; quercetin

基金项目: 河南省重点科技攻关项目(122102110185, 122102110224); 河南省成果转化项目(132201310002)

作者简介: 王林, 硕士, 从事中兽药开发与应用研究。

通讯作者: 张国祖。E-mail: zhangguozu@126.com

四味穿心莲散是兽医临床常用的经典配方, 现收载于2010版《兽药典》二部。该药由穿心莲、大青叶、辣蓼和葫芦茶4味药材组成, 有清热解毒、除湿化滞之功效。在临床上广泛用于畜禽泻痢、积滞等疾病, 治疗效果较好^[1]。

中药超微粉是利用超微粉碎技术得到的中药超细粉末, 中药的颗粒细度达到48 μm以下, 细胞破壁率达到85%以上。其优势在于增加有效成分溶出率, 提高生物利用度, 减少用药量等。四味穿心莲超微粉综合了四味穿心莲散和超微粉的优势, 使四味穿心莲散药理作用得到最大发挥, 不仅明显降低用药成本, 且无污染、无残留, 在兽医临床应用潜力巨大^[2-3]。

目前, 四味穿心莲散的质量标准中仅有显微鉴别和穿心莲的薄层鉴别, 很难完全控制药物的质量。此外, 有关辣蓼和葫芦茶的薄层鉴别研究多见于单药材, 鲜有复方制剂或超微粉制剂的相关研究^[4-5]。因此, 本试验研究了四味穿心莲超微粉中穿心莲、大青叶、辣蓼和葫芦茶的薄层鉴别方法, 为其质量控制提供依据。

1 仪器与试剂

AUW220D1 电子天平, 岛津国际贸易有限公司; GZX-9030 MBE 电热恒温鼓风干燥箱, 上海博讯实业有限公司医疗设备厂; JCX-400GZ 超声波清洗器, 山东省济宁市超声电子仪器厂。

四味穿心莲散, 批号15060201, 河南省康星药业股份有限公司生产; 四味穿心莲超微粉, 批号分别为15061501、15051801、15070401, 实验室自制, 用超微粉碎技术将四味穿心莲散粉碎到至少95%颗粒, 在48 μm以下; 穿心莲对照药材, 批号121082-201004, 中国药品生物制品检定所; 穿心莲内酯对照品, 批号110797-200307, 中国药品生物制品检定所; 脱水穿心莲内酯对照品, 批号110854-201007, 中国药品生物制品检定所; 靛玉红对照品, 含量99.9%, 批号110713-200911, 中国药品生物制品检定所; 芦丁对照品, 含量91.9%, 批号100080-201409, 中国食品药品检定研究院; 槲皮素, 批号100081-201509, 含量98.6%, 中国

食品药品检定研究院。水为去离子透析水(Minipore 纯水器); 乙酸乙酯、丙酮、三氯甲烷、环己烷、甲醇等为分析纯, 天津市四友精细化学品有限公司; 硅胶G薄层板及硅胶GF₂₅₄薄层板, 青岛海洋化工厂生产。

2 方法

2.1 穿心莲的薄层鉴别 该鉴别方法源自《兽药典》所载的四味穿心莲散鉴别(2)的方法^[1], 以穿心莲为对照药材, 以穿心莲内脂和脱水穿心莲内脂为对照品进行质量控制。将普通散剂的鉴别方法应用于超微粉剂型, 并对对照品浓度和样品点样量进行了优化, 具体过程如下。

2.1.1 供试品溶液的制备 取四味穿心莲超微粉1 g, 置具塞锥形瓶中, 加乙醇5 mL, 超声处理30 min, 滤过, 滤液作为供试品溶液。

2.1.2 对照药材溶液的制备 取穿心莲对照药材0.5 g, 照2.1.1处理方法制成对照药材溶液。

2.1.3 对照品溶液的制备 取穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯对照品各10 mg, 置10 mL量瓶中, 加无水乙醇至刻度, 摇匀, 制成每1 mL各含1 mg的混合溶液, 作为对照品溶液。

2.1.4 阴性样品溶液的制备 按照四味穿心莲超微粉处方制备不含穿心莲的阴性样品, 称取1 g, 按2.1.1项下处理方法处理, 制成不含穿心莲的阴性样品溶液。

2.1.5 薄层色谱试验 吸取上述溶液各10 μL, 分别点于同一硅胶GF₂₅₄薄层板上, 以三氯甲烷-乙酸乙酯-甲醇(4:3:0.4)为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 置紫外光灯(254 nm)下检视, 观察供试品色谱中, 在与对照药材色谱和对照品色谱相应的位置上, 是否有相同颜色的斑点。

2.2 靛玉红的薄层鉴别 靛玉红是大青叶中所含的重要成分, 本方法通过靛玉红的鉴别来控制大青叶的质量。该方法是在2010版《兽药典》所载的大青叶鉴别(2)的方法优化而来, 将单味药的薄层鉴别用于复方的鉴别中。样品的称样量、提取试剂添加量均通过单味药材的量进行折算, 并对不同对照品浓度和不同展开剂进行对比, 筛选出最优的薄层

鉴别方法, 具体如下。

2.2.1 供试品溶液的制备 取四味穿心莲超微粉 3 g, 置具塞锥形瓶中, 加三氯甲烷 40 mL, 超声处理 30 min, 滤过, 滤液蒸干, 残渣加甲醇 1 mL 使溶解, 作为供试品溶液。

2.2.2 对照品溶液的制备 取靛玉红对照品 2.5 mg, 置 10 mL 量瓶中, 加三氯甲烷至刻度, 摇匀, 制成每 1 mL 含 0.25 mg 的溶液, 作为对照品溶液。

2.2.3 阴性样品溶液的制备 按照四味穿心莲超微粉处方制备不含大青叶的阴性样品, 称取 3 g, 按 2.2.1 处理方法处理, 制成不含大青叶的阴性样品溶液。

2.2.4 薄层色谱试验 吸取上述溶液各 5 μ L, 分别点于同一硅胶 G 薄层板上, 以苯 - 三氯甲烷 - 丙酮(5:4:2)为展开剂, 展开, 取出, 晾干。观察供试品色谱中, 在与对照品色谱相应的位置上, 是否有相同的浅紫红色斑点。

2.3 芦丁的薄层鉴别 关于芦丁的薄层鉴别方法较多, 含芦丁成分的单药和复方均有文献报道^[6-7]。本文查阅大量文献, 通过称样量、点样量的比较, 并尝试了文献中不同展开剂和显色剂, 筛选出最为合理的各种条件, 建立了四味穿心莲超微粉中芦丁的薄层鉴别方法, 具体内容如下。

2.3.1 供试品溶液的制备 取四味穿心莲超微粉 3 g, 置具塞锥形瓶中, 加乙醇 30 mL, 温浸 1 h, 滤过, 滤液蒸干, 残渣加乙醇 0.5 mL 使溶解, 作为供试品溶液。

2.3.2 辣蓼和葫芦茶样品溶液的制备 称取辣蓼和葫芦茶各 0.6 g, 分别按 2.3.1 处理方法处理, 得到辣蓼和葫芦茶单味药材的样品溶液。

2.3.3 对照品溶液的制备 取芦丁对照品 5 mg, 置 10 mL 量瓶中, 加乙醇至刻度, 摇匀, 制成每 1 mL 含 0.5 mg 的溶液, 作为对照品溶液。

2.3.4 阴性样品溶液的制备 按照四味穿心莲超微粉处方制备不含葫芦茶的阴性样品, 称取 3 g, 按 2.3.1 处理方法处理, 制成不含葫芦茶的阴性样品溶液。

2.3.5 薄层色谱试验 吸取上述溶液各 10 μ L, 分别点于同一硅胶 G 薄层板上, 以乙酸乙酯 - 甲酸 - 水(8:1:1)为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 喷以 5% 三

氯化铝乙醇溶液, 在 105 $^{\circ}$ C 加热至斑点显色清晰。置紫外光灯(365 nm)下检视, 观察供试品色谱中, 在与对照品色谱相应的位置上, 是否有相同颜色的荧光斑点。

2.4 槲皮素的薄层鉴别 关于槲皮素的薄层鉴别方法较多, 但都集中于含槲皮素的单味药材, 含槲皮素的复方药的薄层鉴别方法报道较少^[8-9]。本试验通过文献报道的各种槲皮素提取方法的对比, 尝试不同的展开剂和显色剂, 筛选出最为合理的各种条件, 建立了四味穿心莲超微粉中槲皮素的薄层鉴别方法, 具体内容如下。

2.4.1 供试品溶液的制备 取四味穿心莲超微粉 5 g, 加 80% 甲醇 80 mL, 加热回流 1 h, 放冷, 滤过, 滤液蒸干, 残渣加水 10 mL 使溶解, 用乙醚振摇提取 2 次, 每次 10 mL, 弃去乙醚液, 水液加稀盐酸 10 mL, 置水浴中加热 1 h, 取出, 迅速冷却, 用乙酸乙酯振摇提取 2 次, 每次 20 mL, 合并乙酸乙酯液, 用水 30 mL 洗涤, 弃去水液, 乙酸乙酯液蒸干, 残渣加甲醇 1 mL 使溶解, 作为供试品溶液。

2.4.2 辣蓼和葫芦茶样品溶液的制备 称取辣蓼和葫芦茶各 1 g, 分别按 2.4.1 处理方法处理, 得到辣蓼和葫芦茶单味药材的样品溶液。

2.4.3 对照品溶液的制备 取槲皮素对照品 2.5 mg, 置 25 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 制成每 1 mL 含 0.1 mg 的溶液, 作为对照品溶液。

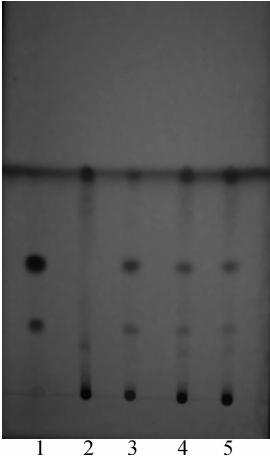
2.4.4 阴性样品溶液的制备 按照四味穿心莲超微粉处方制备不含辣蓼和葫芦茶的阴性样品, 称取 5 g, 按 2.4.1 处理方法处理, 制成不含辣蓼和葫芦茶的阴性样品溶液。

2.4.5 薄层色谱试验 吸取上述溶液各 5 μ L, 分别点于同一硅胶 G 薄层板上, 以甲苯 - 乙酸乙酯 - 甲酸(10:8:1)为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 喷以 5% 三氯化铝乙醇溶液, 在 105 $^{\circ}$ C 加热数分钟, 置紫外光灯(365 nm)下检视。观察供试品色谱中, 在与对照品色谱相应的位置上, 是否显相同颜色的荧光斑点。

3 结果与分析

3.1 穿心莲的薄层鉴别 穿心莲的薄层鉴别结果见图 1, 在紫外 254 nm 光源下检视, 在对照品和

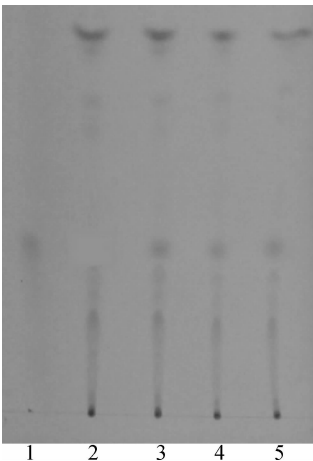
对照药材位置,供试品溶液出现了相同颜色的斑点,阴性样品溶液没有出现对应斑点,说明该方法无阴性干扰,可以有效鉴别四味穿心莲超微粉中的穿心莲。



1. 穿心莲内脂和脱水穿心莲内脂对照品;
2. 不含穿心莲的阴性;3. 穿心莲对照药材;
4. 15061501;5. 15051801

图1 穿心莲薄层鉴别结果

3.2 靛玉红的薄层鉴别 靛玉红的薄层鉴别结果见图2,在白光下检视,在靛玉红对照品位置,供试品溶液出现了相同的浅紫红色斑点,阴性样品溶液没有出现对应斑点,说明该方法无阴性干扰,可以有效鉴别四味穿心莲超微粉中的大青叶所含的靛玉红成分。

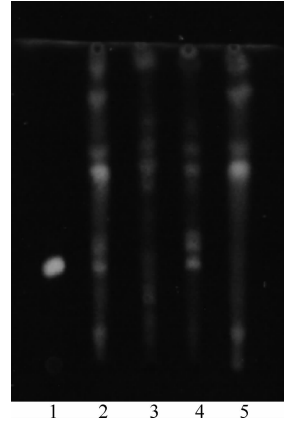


1. 靛玉红对照品;2. 不含大青叶的阴性;
3. 15061501;4. 15051801;5. 15070401

图2 靛玉红薄层鉴别结果

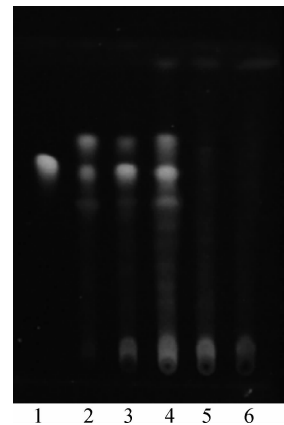
3.3 芦丁的薄层鉴别 芦丁的薄层鉴别结果见图3,在紫外365 nm光源下检视,在对照品位置,葫芦茶和供试品溶液出现了相同颜色的荧光斑点,而辣蓼和阴性样品溶液没有出现对应斑点,说明葫芦茶含有芦丁成分,辣蓼中芦丁太少或者不含芦丁。阴性样品没有干扰,可以有效鉴别四味穿心莲超微粉中葫芦茶所含的芦丁成分。

3.4 槲皮素的薄层鉴别 槲皮素的薄层鉴别结果见图4,在紫外365 nm光源下检视,在对照品位置,供试品溶液出现了相同颜色的荧光斑点,阴性样品溶液没有出现对应斑点,说明该方法无阴性干扰,可以有效鉴别四味穿心莲超微粉中的辣蓼和葫芦茶所含的槲皮素成分。



1. 芦丁对照品;2. 葫芦茶;3. 辣蓼;
4. 15061501;5. 不含葫芦茶的阴性

图3 芦丁薄层鉴别结果



1. 槲皮素对照品;2. 葫芦茶;3. 辣蓼;4. 15061501;
5-6. 不含辣蓼和葫芦茶的阴性

图4 槲皮素薄层鉴别结果

4 讨论与小结

靛玉红的薄层鉴别中,最初选用的展开剂是兽药典上大青叶鉴别(2)的展开剂正己烷-三氯甲烷-丙酮(5:4:2),结果发现此种展开剂条件下药物色素和靛玉红斑点重叠,出现了杂质干扰。通过对比尝试,最终发现苯替代正己烷之后,色素和靛玉红斑点分离较好,因此本试验选用苯-三氯甲烷-丙酮(5:4:2)作为展开剂。以上说明,复方药物的薄层鉴别不能简单照搬单味药材的薄层鉴别条件,需要考察各种条件进行优化。

有文献^[10-11]报道葫芦茶和辣蓼中均含有芦丁成分,因此本试验按照供试品处理方法,分别称取相应处方量的葫芦茶和辣蓼进行研究。结果发现,葫芦茶可以明显鉴别出芦丁成分,但辣蓼中未鉴别出芦丁,说明辣蓼中芦丁含量很少,明显低于葫芦茶。因此,该方法主要控制四味穿心莲超微粉中的葫芦茶。

有文献报道^[12-13]葫芦茶和辣蓼均含有槲皮素成分,因此本实验按照供试品处理方法,分别称取相应处方量的葫芦茶和辣蓼进行研究。结果发现,葫芦茶和辣蓼在此方法下都可以明显鉴别出槲皮素成分。因此,该方法可以同时控制四味穿心莲超微粉中的辣蓼和葫芦茶。

本文分别对四味穿心莲超微粉的四种成分进行薄层鉴别研究,方法简单快速,可以有效控制四味穿心莲超微粉的质量。试验过程中也对普通散剂进行了对比,发现该方法同样适用于四味穿心莲散的薄层鉴别,因此可以认为,物理粉碎使细胞达到破壁之后,药材的有效化学成分仍未发生变化,

也为四味穿心莲普通散剂的质量标准研究提供思路。

参考文献:

- [1] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典 2010 年版二部[S].
- [2] 周希平,付夫根. 中药超微粉在兽医临床的应用前景[J]. 中兽医学杂志, 2011, (2): 53-54.
- [3] 李茜,侯海锋. 中药超微粉在畜禽养殖业中的应用前景[J]. 动物医学进展, 2010, 31(S): 260-262.
- [4] 刘亮,冯华,刘英波,等. 黔产辣蓼中槲皮素的薄层鉴别与含量测定[J]. 贵州农业科学, 2015, 43(10): 191-194.
- [5] 钱彦丛,刘景东,郝勇,等. 槐叶和龙爪槐叶中芦丁的薄层鉴别[J]. 黑龙江医学, 2002, 15(6): 435-436.
- [6] 常瑛,王四旺,张超,等. 辣蓼中芦丁的薄层及紫外光谱鉴别[J]. 现代生物医学进展, 2006, 6(10): 46-47.
- [7] 徐鹏虎. 正心降脂片中芦丁薄层鉴别方法的改进[J]. 中国动物营养, 2012, 22(10).
- [8] 侯文欣,魏红立,方新平,等. 凤仙花中槲皮素和山奈酚的薄层色谱鉴别[J]. 安徽农业科学, 2015, 43(34): 146-147.
- [9] 杨修镇. 甜地丁中槲皮素的薄层鉴别和含量测定[J]. 中国兽药杂志, 2014, 48(2): 28-30.
- [10] 农莉,陈勇,刘鼎,等. 葫芦茶化学成分、质量控制及药理作用研究进展[J]. 2014, 10(2): 46-48.
- [11] 黄泓泓,甄汉深. 中草药辣蓼近年来的研究进展[J]. 中国民族民间医药, 2013, 22(1): 38-40.
- [12] 冯华,刘英波,刘亮,等. 辣蓼不同部位槲皮素的含量测定及 HPLC 指纹图谱[J]. 中国医药工业杂志, 2016, 47(4): 411-414.
- [13] 周旭东,吕晓超,史丽颖,等. 葫芦茶地上部分化学成分的研究[J]. 广西植物, 2013(4): 575-578.

(编辑:陈希)