

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2022.08.022

消癥化瘀灌肠液薄层色谱鉴别研究

刘凤乐, 罗悠悠, 高文全, 陈忻宇, 王蕊蕊[△]

(云南省大理白族自治州中医医院, 云南 大理 671000)

摘要:目的 建立消癥化瘀灌肠液的薄层色谱(TLC)鉴别方法。方法 采用TLC法,对制剂中的黄柏、黄芪、丹参、延胡索、甘草5味药材进行定性鉴别。结果 各薄层板显示主斑点清晰,分离度好,阴性对照无干扰。结论 该方法重复性、耐用性好,能较好地对消癥化瘀灌肠液进行定性鉴别。

关键词:消癥化瘀灌肠液;薄层色谱法;黄柏;黄芪;丹参;延胡索;甘草

中图分类号:R917;R284.1;R286.0

文献标志码:A

文章编号:1006-4931(2022)08-0089-04

Study on the TLC identification of Xiaozheng Huayu Enema

LIU Fengle, LUO Youyou, GAO Wenquan, CHEN Xinyu, WANG Ruirui

(Dali Bai Autonomous Prefecture Chinese Medicine Hospital, Dali, Yunnan, China 671000)

Abstract: Objective To establish the thin-layer chromatography (TLC) identification method of Xiaozheng Huayu Enema.

Methods The qualitative of Phellodendri Chinensis Cortex, Astragali Radix, Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma, Corydalis Rhizoma, Glycyrrhizae Radix et Rhizoma in Xiaozheng Huayu Enema were identified by TLC method. **Results** The TLC spots of Phellodendri Chinensis Cortex, Astragali Radix, Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma, Corydalis Rhizoma, Glycyrrhizae Radix et Rhizoma were clear and well separated, and the negative samples had no interference. **Conclusion** The method is repeatable and durable, which can be used for qualitative identification of Xiaozheng Huayu Enema.

Key words: Xiaozheng Huayu Enema; TLC; Phellodendri Chinensis Cortex; Astragali Radix; Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma; Corydalis Rhizoma; Glycyrrhizae Radix et Rhizoma

消癥化瘀灌肠液由黄柏、黄芪、延胡索、丹参、川芎、甘草、当归、败酱草、鱼腥草等10余味药材组方,黄柏为君药,有清热燥湿、泻火除蒸、解毒疗疮等功效,黄芪、延胡索、丹参、当归、败酱草等为臣药,可补气行气、活血化瘀、理气止痛、排脓,配伍鱼腥草、甘草等佐使药,共奏活血化瘀、清热利湿、理气止痛功效,临床主要用于治疗急慢性盆腔炎症^[1]。薄层色谱(TLC)法因重复性好、对设备要求较低、方便易操作等特点常用于中药复方制剂质量标准中定性鉴别研究。本研究中采用TLC法对制剂中黄柏、黄芪、丹参、延胡索、甘草5味药材进行了定性鉴别。现报道如下。

1 仪器与试药

1.1 仪器

PS-30型超声波清洗仪(深圳市洁康洗净电器有限公司);SP-Ⅲ型薄层条带点样器(上海科哲生化科技有限公司);DHG-9030型电热恒温鼓风干燥箱(上海齐欣科学仪器有限公司);DV215CD型电子分析天平(美国奥豪斯仪器有限公司);HH-4型数显恒温水浴锅(常州国华仪器制造有限公司)。

1.2 试药

丹参对照药材(批号为120923-201615),黄柏对

照药材(批号为121510-201606),盐酸小檗碱对照品(批号为110713-201613,含量为86.8%),延胡索对照药材(批号为120928-201609),甘草对照药材(批号为120904-202021),延胡索乙素对照品(批号为110726-201819,含量为99.8%),黄芪甲苷对照品(批号为110781-201606,含量为97.4%),黄芪对照药材(批号为120974-201612),丹酚酸B对照品(批号为111562-201917,含量为96.6%),均购自中国食品药品检定研究院;薄层层析硅胶G板(青岛海洋化工厂、烟台江友硅胶有限公司、浙江台州生化塑料厂,规格为10 cm × 10 cm或10 cm × 20 cm);消癥化瘀灌肠液(批号分别为20210301, 20210302, 20210303)及其阴性样品均由医院制剂室提供;其余试剂均为分析纯,水为娃哈哈纯净水。

2 方法与结果

2.1 TLC鉴别

黄柏^[2-3]:取样品2 mL,加甲醇20 mL,加稀盐酸调pH至2,超声(功率180 W,频率40 kHz,下同)处理30 min,滤过,取续滤液浓缩至2 mL,即得供试品溶液。称取盐酸小檗碱对照品9.74 mg,精密称定,置10 mL容量瓶中,用甲醇溶解并定容,即得质量浓度为0.97 mg/mL的对照

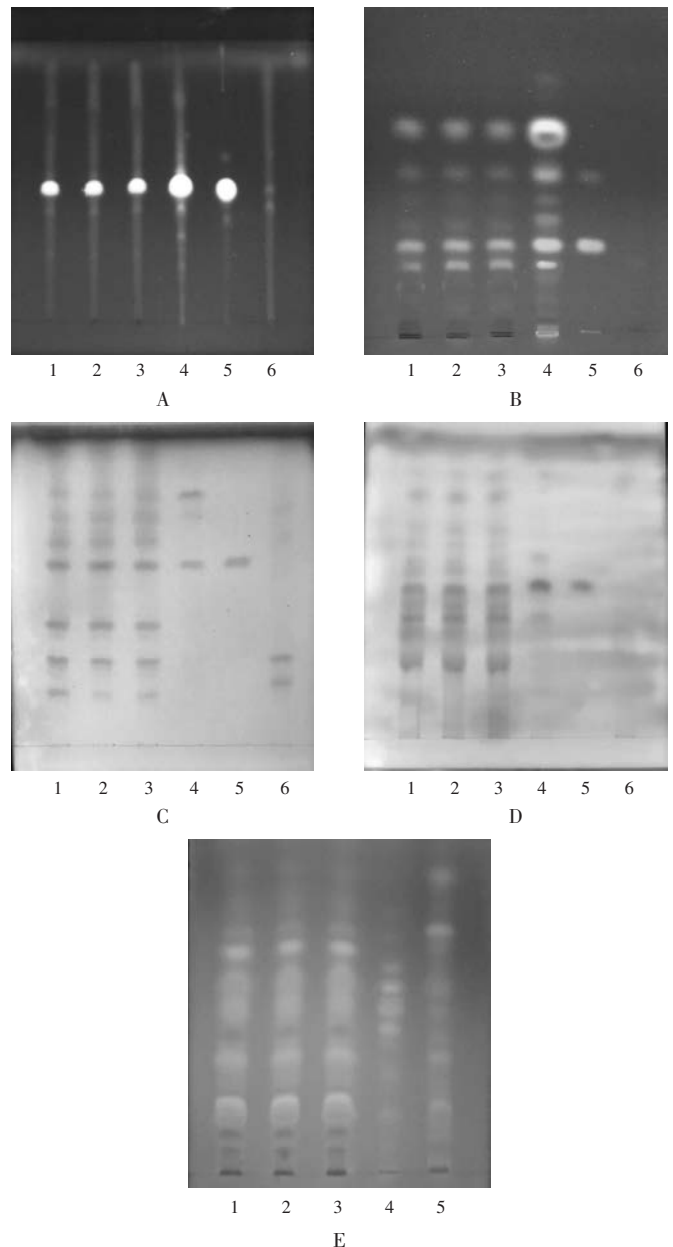
第一作者:刘凤乐,男,硕士研究生,主管中药师,研究方向为院内中药制剂研发及药事管理,(电子信箱)llfcpu@163.com。

[△]通信作者:王蕊蕊,女,硕士研究生,主管中药师,研究方向为院内中药制剂研发及管理,(电子信箱)250747436@qq.com。

品溶液。称取黄柏对照药材粉末0.15 g,精密称定,加甲醇20 mL混匀,再加稀盐酸调pH至2,超声30 min,滤过,滤液浓缩至2 mL,即得对照药材溶液。取缺黄柏的阴性样品,按供试品溶液制备方法制得阴性对照品溶液。参考2020年版《中国药典(四部)》通则0502 TLC法,吸取上述供试品溶液、阴性对照品溶液各1.5 μ L,对照品溶液、对照药材溶液各1 μ L,分别点于同一硅胶G薄层板上以正丁醇-冰醋酸-水(7:1:2, V/V/V)为展开剂,展距8 cm,展开,晾干后置紫外光灯(365 nm)下检视。结果供试品溶液色谱与对照品溶液、对照药材溶液色谱相应位置的荧光斑点颜色一致,阴性对照无干扰,详见图1 A。

延胡索^{[4]315,[5]}:取样品10 mL,加浓氨试液调至碱性,分别加乙醚30 mL振摇提取3次,合并提取液,蒸干,加甲醇1 mL溶解残渣,即得供试品溶液。称取延胡索乙素对照品1.25 mg,精密称定,置5 mL容量瓶中,加甲醇溶解并定容,制成质量浓度为0.25 mg/mL的对照品溶液。称取延胡索对照药材粉末1 g,精密称定,加甲醇50 mL溶解,超声处理30 min,滤过,蒸干滤液,残渣加水10 mL使溶解,用浓氨试液调至碱性,分别加乙醚10 mL振摇提取3次,合并提取液,蒸干,残渣加甲醇1 mL使溶解,即得对照药材溶液。取缺延胡索的阴性样品,按供试品溶液制备方法制得阴性对照品溶液。参考2020年版《中国药典(四部)》通则0502 TLC法,吸取上述阴性对照品溶液、供试品溶液各10 μ L,对照药材溶液5 μ L,对照品溶液2 μ L,分别点于同一硅胶G薄层板上,以甲苯-丙酮(6:1, V/V)为展开剂,预饱和30 min,展距11 cm,展开,取出,晾干后置碘缸中,约3 min后取出,挥尽板上吸附的碘,置紫外光灯(365 nm)下检视。结果供试品溶液色谱与对照品溶液及对照药材溶液色谱相应位置的荧光斑点颜色一致,阴性对照无干扰,详见图1 B。

黄芪^{[4]315,[6]}:取样品5 mL,以水饱和的正丁醇振摇提取3次,每次10 mL,合并正丁醇液,分别以15 mL 1% NaOH溶液洗涤3次,倒掉NaOH液,正丁醇用水洗至中性,取正丁醇液,置水浴蒸干,加甲醇1 mL溶解残渣,即得供试品溶液。称取黄芪甲苷对照品5.03 mg,精密称定,置5 mL容量瓶中,加甲醇溶解并定容,得质量浓度为1.01 mg/mL的对照品溶液。称取黄芪对照药材粉末2.25 g,精密称定,加水30 mL使溶解,加热回流1 h,滤过,取续滤液,浓缩至10 mL,分别以水饱和的正丁醇20 mL振摇提取3次,合并正丁醇,分别以1%NaOH溶液15 mL洗涤3次,取正丁醇液,用水洗至中性,取正丁醇液,置水浴蒸干,再加甲醇1 mL溶解残渣,即得对照药材溶液。取缺黄芪的阴性样品,按供试品溶液制备方法制成阴性对照品溶液。参考2020年版《中国药典(四部)》通则0502 TLC法试验,吸取上述阴性对照品溶液、供试



1-3. 供试品溶液 4. 对照药材溶液 5. 对照品溶液
6. 阴性对照品溶液
A. 黄柏 B. 延胡索 C. 黄芪 D. 丹参 E. 甘草

图1 薄层色谱图

1-3. Test solution 4. Reference medicinal material solution 5. Reference solution 6. Negative reference solution
A. Phellodendri Chinensis Cortex B. Corydalis Rhizoma C. Astragali Radix D. Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma E. Glycyrrhizae Radix et Rhizoma

Fig. 1 TLC chromatograms

品溶液各10 μ L,对照药材溶液5 μ L,对照品溶液2 μ L,分别点于同一硅胶G薄层板上,以氯仿-甲醇-水(13:7:2, V/V/V),静置下层液为展开剂,预饱和30 min,展距10 cm,展开,晾干后喷10%硫酸乙醇溶液,在105 $^{\circ}$ C加热,待斑点显色清晰停止。结果供试品溶液色谱与对照品溶液、对照药材溶液色谱相应位置的斑

点颜色一致,阴性对照无干扰,详见图1 C。

丹参^{[4]79,[7]}:取样品10 mL,加稀盐酸调pH至2,再用乙酸乙酯振摇提取2次,每次20 mL,取乙酸乙酯液,置水浴蒸干,加甲醇1 mL溶解残渣,即得供试品溶液。称取丹酚酸B对照品5.14 mg,精密称定,置5 mL容量瓶中,用甲醇溶解并定容,制成质量浓度为1.03 mg/mL的对照品溶液。称取丹参对照药材粉末0.2 g,加水25 mL使溶解,加热回流1 h,滤过,取续滤液,用稀盐酸调pH至2,分别以乙酸乙酯振摇提取2次,取乙酸乙酯液,置水浴蒸干,加1 mL甲醇溶解残渣,即得对照药材溶液。取缺丹参的阴性样品,按供试品溶液制备方法制得阴性对照品溶液。参考2020年版《中国药典(四部)》通则0502 TLC法,吸取上述阴性对照品溶液、供试品溶液各2 μ L,对照品溶液5 μ L,对照药材溶液2 μ L,分别点于同一硅胶G薄层板上,氯仿-甲苯-乙酸乙酯-甲醇-甲酸(3:2:5:0.5:2, V/V/V/V/V)为展开剂,展距为11 cm,展开,晾干后喷以5%三氯化铁显色。结果供试品溶液色谱与对照品溶液、对照药材溶液色谱相应位置的斑点颜色一致,阴性对照无干扰,详见图1 D。

甘草^[8-9]:取样品10 mL,分别以乙醚20 mL振摇提取3次,收集提取溶液,蒸干,加1 mL甲醇溶解残渣,即得供试品溶液。取甘草对照药材粉末1 g,加水50 mL使溶解,加热回流30 min,滤过,取续滤液,按供试品溶液制备方法制成对照药材溶液。取缺甘草的阴性样品,按供试品溶液制备方法,制备阴性对照品溶液。参考2020年版《中国药典(四部)》通则0502 TLC法,吸取上述阴性对照品溶液、供试品溶液各15 μ L,对照药材溶液6 μ L,分别点于同一硅胶G薄层板上,以甲苯-乙酸乙酯-冰醋酸(14:6:0.5, V/V/V)为展开剂,展距12 cm,展开,取出,喷以10%硫酸乙醇溶液,105 $^{\circ}$ C加热至斑点显色清晰,置紫外光灯(365 nm)下检视。结果供试品溶液色谱与对照药材溶液色谱相应位置的荧光斑点颜色一致,阴性对照无干扰,详见图1 E。

2.2 耐用性考察

黄柏:3个厂家薄层板展开时间跨度为36~133 min,分离度存在一定差异,但斑点行为一致,重复性好;条带点样和圆点点样方式分离度均较好,斑点清晰;点样量为1.5,3.0,5.0 μ L时,薄层展开行为一致,斑点分离度较好,清晰可辨。

延胡索:3个厂家薄层板展开时间跨度为14~45 min,分离度存在差异较小,斑点行为一致,重复性好;条带点样方式的斑点分离度均较好,圆点点样方式斑点分离度稍差;点样量为5,10,15 μ L时,展开行为一致,斑点分离度较好,5 μ L点样量斑点颜色较淡。

黄芪:3个厂家薄层板展开时间跨度为20~70 min,分离度存在差异较小,斑点行为一致,重复性好;条带

点样方式的斑点分离度均较好,可清晰辨识,圆点点样方式斑点显色较慢、颜色较淡;点样量为5,10,15 μ L时,展开行为一致,斑点分离度较好,5 μ L点样量斑点颜色较淡。

丹参:3个不同厂家的薄层板展开时间跨度为24~55 min,分离度差异较小,斑点行为一致,重复性好;条带点样和圆点点样方式的斑点分离度均较好,可清晰辨识;点样量为5,10,15 μ L时,展开行为一致,斑点分离度较好,不同体积点样量斑点颜色稍有差异。

甘草:3个厂家薄层板展开时间跨度为35~55 min,重复性好;条带点样和圆点点样方式的展开行为一致,圆点点样方式分离度稍差;点样量为5,10,15 μ L时,斑点分离度较好,斑点颜色稍有差异。

另选取黄柏、黄芪、丹参、延胡索、甘草5味药材,分别在温度5 $^{\circ}$ C、相对湿度58%,以及温度25 $^{\circ}$ C、相对湿度45%条件下进行试验,结果重复性、耐用性均较好。

3 讨论

预试验中对当归-川芎药对^[10]及败酱草^[11]等臣药进行了研究,由于始终无法排除阴性干扰或因与对照药材、对照品斑点不一致,无法列入质量标准草案。最终确定纳入黄柏、黄芪、延胡索、丹参、甘草5味药材的TLC鉴别。

本研究中参考2020年版《中国药典》,并查阅了大量文献,结合尽量少用或不用毒性较大试剂、样品处理过程简单等原则,分别对文中所选5味药材的供试品溶液制备方法、展开条件、显色方法等反复优化,并分别对不同的薄层板、温湿度条件、点样方式、点样量、显色方法等条件进行考察。其中甘草的预试验中采用乙酸乙酯-甲酸-冰醋酸-水(15:1:1:2, V/V/V/V)为展开系统^[12-13],结果斑点均显色,但位置不一致。最终采用甲苯-乙酸乙酯-冰醋酸(14:6:0.5, V/V/V)为展开系统。结果各薄层板显示主斑点清晰,分离度好,阴性对照无干扰。各药材在相应薄层板展开时间跨度内斑点行为一致,重复性好,且在不同点样方式和点样量下的薄层展开行为一致,斑点分离度较好。

综上所述,本研究中所建立的黄柏等5味药材TLC鉴别方法,耐用性、重复性等符合要求,能对消癥化瘀灌肠液所含药味进行定性鉴别。

参考文献

- [1] 刘凤乐,邱 逊,高文全,等. 卤素水分测定法结合高效液相色谱法优选妇科灌肠液提取工艺的研究[J]. 中国药业, 2017,26(20):17-20.
- [2] 白 妮,刘 杰,张红梅,等. 清热解毒口服液质量标准研究[J]. 世界中医药,2019,14(2):301-305.
- [3] 张 璐,张 斌,赖梅生. 柏地威湿疹凝胶剂的制备及质量控制方法的研究[J]. 应用化工,2018,47(2):306-311.
- [4] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京: