

基于微乳薄层色谱技术分离鉴定 2种医院制剂中的黄酮类成分

高颖¹, 房德敏^{1*}, 周波², 严震³

(1. 天津市天津医院, 天津 300211; 2. 重庆市合川区妇幼保健院, 重庆 401520;
3. 梧州市新型农村合作医疗管理中心, 广西 梧州 543000)

[摘要] **目的:**建立舒筋定痛胶囊和苏氏接骨胶囊中黄酮类成分的微乳薄层色谱鉴别方法,为该技术的推广提供参考。**方法:**以微乳液为展开剂,聚酰胺薄膜为固定相,通过单因素试验考察表面活性剂的种类和浓度、助表面活性剂、油相、含水量及有机改性剂等对分离度的影响。通过调节微乳体系各组分的组成,优选薄层色谱条件分离检测舒筋定痛胶囊和苏氏接骨胶囊中黄酮类有效成分。**结果:**以含水量75%的十二烷基硫酸钠(SDS)-正丁醇-正辛烷(3.4:7.3:2.0)微乳液-甲酸(9:1)为展开剂可分离鉴别出舒筋定痛胶囊中柚皮苷;以含水量75%的SDS-正丁醇-正庚烷(2.7:6.3:1.0)微乳液-甲酸(9:1)为展开剂可分离鉴别出苏氏接骨胶囊中金丝桃苷。**结论:**建立的微乳薄层色谱方法简便、准确、高效,可用于苏氏接骨胶囊中菟丝子和舒筋定痛胶囊中骨碎补的定性鉴别。

[关键词] 微乳液; 薄层色谱; 柚皮苷; 金丝桃苷; 舒筋定痛胶囊; 苏氏接骨胶囊

[中图分类号] R283.6;R284.1;R944.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)12-0058-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015120058

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20150428.1012.003.html>

[网络出版时间] 2015-04-28 10:12

Separation and Identification of Flavonoids from Two Kinds of Hospital Preparations by Micro-emulsion Thin Layer Chromatography GAO Ying¹, FANG De-min^{1*}, ZHOU Bo², YAN Zhen³ (1. Tianjin Hospital, Tianjin 300211, China; 2. Hechuan Maternity and Child Care Hospital, Chongqing 401520, China; 3. Wuzhou New Rural Cooperative Medical Management Center, Wuzhou 543000, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate application of micro-emulsion thin layer chromatography (ME-TLC) in separation and identification of flavonoids in Shujin Dingtong capsules and Su's Jiegu capsules. **Method:** Using microemulsion as developing agent in combination with polyamide film as the stationary phase, factors for microemulsion resolution, such as types and concentrations of surfactants, co-surfactants, the oil phase, impact of moisture and organic modifier were investigated by adjusting composition of each component in microemulsion system to find the best TLC conditions for separation and detection of flavonoids in Shujin Dingtong capsules and Su's Jiegu capsules. **Result:** Naringin in Shujin Dingtong capsules were separated and identified simultaneously with developing agent of micro-emulsion form-acetic acid (9:1), micro-emulsion was sodium dodecyl sulfate (SDS) -*n*-butyl alcohol-*n*-octane-H₂O (3.4:7.3:2.0:75.0). Hyperin in Su's Jiegu capsules was separated and identified simultaneously with developing agent of micro-emulsion form-acetic acid (9:1), micro-emulsion was SDS-*n*-butyl alcohol-*n*-heptane-H₂O (2.7:6.3:1.0:75.0). Compared with the organic developing solvent, separation effect of micro-emulsion was improved. **Conclusion:** METLC is a new and efficient method for separation and identification of flavonoids in Shujin Dingtong capsules and Su's Jiegu capsules.

[Key words] microemulsion; thin layer chromatography; naringin; hyperin; Shujin Dingtong capsules; Su's Jiegu capsules

[收稿日期] 20141015(001)

[第一作者] 高颖,主管药师,从事医院制剂质量标准及中成药合理应用研究,Tel:13820410188,E-mail:gyt2c@126.com

[通讯作者] *房德敏,主任药师,硕士生导师,从事药物开发及其合理利用研究,Tel:022-60910495,E-mail:fdm_wx@126.com

微乳薄层色谱已被用于中药材和中成药中黄酮类、皂苷类、生物碱类、氨基酸等成分的分离鉴定^[1-5]。苏氏接骨胶囊和舒筋定痛胶囊是天津市天津医院的院内制剂,苏氏接骨胶囊由骨碎补、续断、土鳖虫、菟丝子和补骨脂等 19 味中药组成,具有舒筋活血、化瘀、补肾壮骨、促进骨折愈合的功效,治疗各种类型的骨折、跌打损伤和骨质疏松疗效显著;舒筋定痛胶囊由当归、红花、乳香、没药等 9 味中药组成,具有活血化瘀、消肿止痛、接骨的功效。为了更好地控制院内制剂质量,本实验以微乳液为展开剂,聚酰胺薄膜为固定相,考察苏氏接骨胶囊和舒筋定痛胶囊中黄酮类成分的微乳薄层色谱行为,重点对影响微乳色谱分离效果的因素进行了系统研究,包括表面活性剂、助表面活性剂、油相、含水量及改性剂等微乳体系中各组分的变化,建立微乳薄层色谱鉴别舒筋定痛胶囊中柚皮苷及苏氏接骨胶囊中金丝桃苷的方法。

1 材料

P-1 型双槽层析玻璃缸和 TG332A 型微量分析天平(湘仪天平仪器厂),ZF-1 型紫外分析仪(上海顾村光电仪器厂)。聚酰胺薄膜(天津市思利达色谱技术开发公司,10 cm × 10 cm,20 cm × 10 cm),金丝桃苷、芦丁、柚皮苷对照品(中国食品药品检定研究院,批号分别为 111521-200303,100080-200707,110722-200309),红花、菟丝子、骨碎补药材(天津市中药饮片厂有限公司,经成都医学院药学院生药教研室钟世红副教授鉴定,均符合 2010 年版《中国药典》一部相关项下要求),舒筋定痛胶囊(批准文号津药制字 Z20070615,批号 20090819,20090907,20091030)、苏氏接骨胶囊(批准文号津药制字 Z20070616 号,批号 100329,100231,100015)均由天津医院制剂室提供,十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)、十二烷基硫酸钠(SDS)均购自天津市科密欧化学试剂有限公司,试剂均为分析纯,水为重蒸馏水。

2 方法与结果

2.1 溶液配制

2.1.1 对照品溶液 精密称取芦丁、柚皮苷、金丝桃苷对照品适量,分别置于 5 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,均配成 1 g·L⁻¹ 对照品溶液。

2.1.2 药材溶液 称取红花药材 5 g,置具塞锥形瓶中,加入 80% 丙酮 50 mL,超声处理 30 min,滤过,滤液蒸干;残渣加甲醇 10 mL 使溶解,过滤,滤液蒸干;残渣加 70% 乙醇 10 mL 使溶解,过滤,滤液蒸干;残渣加水 10 mL 使溶解,溶液用乙酸乙酯 20 mL 振摇提取,分取乙酸乙酯液,蒸干;残渣加甲醇 1 mL

使溶解,得红花药材溶液。另取骨碎补药材 1 g,置圆底烧瓶中,加入甲醇 20 mL 回流 1 h,过滤,滤液浓缩至 2 mL,得骨碎补药材溶液。取菟丝子药材 0.5 g,加甲醇 40 mL,加热回流 30 min,滤过,滤液浓缩至 5 mL,得骨碎补药材溶液。

2.1.3 供试品溶液 取苏氏接骨胶囊 5 g,用乙醚 45 mL 溶解,超声处理 30 min,过滤,取滤渣,挥干乙醚,加甲醇 40 mL 溶解,超声处理 30 min,过滤,取滤液,蒸干后加甲醇溶解并定容至 10 mL,作为苏氏接骨胶囊供试品溶液。另取舒筋定痛胶囊 5 g,置具塞锥形瓶中,加入 80% 丙酮 50 mL,超声处理 30 min,滤过,滤液蒸干;残渣加甲醇 10 mL 使溶解,过滤,滤液蒸干;残渣加 70% 乙醇 10 mL 使溶解,过滤,滤液蒸干;残渣加水 10 mL 使溶解,溶液用乙酸乙酯 20 mL 振摇提取,分取乙酸乙酯液,蒸干,残渣加甲醇 1 mL 使溶解,得舒筋定痛胶囊供试品溶液。

2.1.4 阴性样品溶液 按舒筋定痛胶囊(苏氏接骨胶囊)的处方配比分别取除骨碎补、红花、菟丝子外的其他药材,按制备工艺制成相应的阴性样品,按 2.1.3 项下方法制备阴性样品溶液。

2.1.5 微乳展开剂 将微乳表面成分活性剂(CTAB,SDS)、油相(正庚烷、正己烷、正辛烷)、助表面活性剂(正丁醇),加适量水搅拌溶解,加水至足量,混匀,放置 24 h,即得。临用前加入一定量乙酸作为改性剂。

2.2 表面活性剂考察 分别以 SDS-正丁醇-正庚烷-水(2.7:6.3:1.0:75)阴离子 O/W 型微乳液和 CTAB-正丁醇-正庚烷(2.25:6.75:1.0:75)阳离子 O/W 型微乳液为展开剂,调节甲酸酸度 15%,分离鉴别苏氏接骨胶囊和舒筋定痛胶囊中的主要黄酮类有效成分。结果表明 SDS(阴离子表面活性剂)相对于 CTAB(阳离子表面活性剂)的展开时间短,在添加甲酸(10%)作为改性剂后都能形成圆整的斑点,但由于 CTAB 对 2 种制剂样品的分离不够理想,荧光斑点模糊。在分离鉴定成分较复杂的样品时,SDS 较 CTAB 有明显优势。

2.3 油相种类考察 选择正己烷、正庚烷、正辛烷为油相,考察油相种类对分离效果的影响。在舒筋定痛胶囊各主要成分的分离中,随着油相碳链的增长,比移值均减小,但相差不明显。在点样量相同的条件下,以正辛烷为油相的微乳展开剂的色谱斑点明显比正己烷和正庚烷为油相的展开剂清晰,且对舒筋定痛胶囊样品的展开相对均匀。在正辛烷系统中,红花的斑点数目较多,斑点也相对清晰。在苏氏接骨胶囊样

品的分离中,3种油相的展开时间基本一致,正庚烷体系中菟丝子和苏氏接骨胶样品斑点较多且清晰,故选择正庚烷为微乳液油相。

2.4 SDS-正丁醇-正辛烷体系分离柚皮苷的方法学

2.4.1 SDS含量变化

SDS对色谱的分离度影响较大,SDS质量分数较低时,微乳液的增溶能力较弱,随表面活性剂的增加,微乳液的电荷密度会增加,稳定性增强了,增容作用也会增强,分离能力提高。分别以不同比例 SDS-正丁醇-正辛烷(2.0:6.3:1, 2.7:6.3:1, 3.4:6.3:1, 4.1:6.3:1)配成含水量75%的微乳液并进行薄层展开。结果表明 SDS含量对色谱中各成分的比移值影响较明显,随 SDS配比的增加,与对照品相对应斑点的比移值不断减小;展开时间随着 SDS配比的增加而加长。故应选择低质量分数 SDS较合适。SDS-正丁醇-正辛烷(3.4:6.3:1)对舒筋定痛胶样品分离度最佳,荧光效果最强。

2.4.2 正丁醇配比

微乳的形成需有恰当的助表面活性剂参与,助表面活性剂能降低界面张力、增加界面膜的流动性,有利于形成微乳并增强微乳的稳定性^[6],一般微乳形成的区域大小与助表面活性剂的用量成反比^[7]。选择正丁醇为微乳薄层色谱中的助表面活性剂,它对微乳薄层色谱的分离选择性具有重要影响。分别以不同比例 SDS-正丁醇-正辛烷(3.4:5.3:1, 3.4:6.3:1, 3.4:7.3:1, 3.4:8.3:1)配成含水量75%的微乳液,薄层展开。结果表明在同样含水量情况下,随微乳液中正丁醇比例的增加,柚皮苷对照品的比移值增加,展开时间逐次减小,舒筋定痛胶供试品溶液中与柚皮苷相对应的斑点逐渐清晰,分离度也随之变好;但当其比例增加至8.3时,舒筋定痛胶样品中与柚皮苷相对应的斑点消失,故选择 SDS-正丁醇-正辛烷(3.4:7.3:1)为宜。

2.4.3 油相配比

一般而言,为了保持微乳液的平衡,使其持续透明,微乳液的各组分比例只能在一定范围内变化,尤其是油相的变化范围更窄,因为油相很容易析出分层。在同样含水量下,随着油相的配比逐渐增加,展开时间随之增加,与柚皮苷对照品对应点的比移值随之降低,但降低幅度不大。说明油相占比对展开时间和比移值的影响不大。SDS-正丁醇-正辛烷(3.4:7.3:2.0)的分离度、荧光强度均优于其他3个配比,斑点也更为圆整、清晰。

2.5 SDS-正丁醇-正庚烷-水体系分离金丝桃苷的方法学考察

通过固定微乳体系的组成为 SDS-正丁醇-正庚烷,调节各成分的比例(2.7:6.3:1.0,

4.3:5.7:1.0, 5.1:3.9:1.0)进行比较。结果显示配比 4.3:5.7:1.0 的展开时间过长,且斑点也不清晰,配比 2.7:6.3:1.0 和 5.1:3.9:1.0 的展开效果都比较理想,但由于后者展开时间较长,故选择 SDS-正丁醇-正庚烷(2.7:6.3:1.0)。

2.6 含水量对微乳薄层色谱分离的影响

在保证 SDS-正丁醇-正辛烷(3.4:7.3:1.0)和 SDS-正丁醇-正庚烷(3.7:6.3:1.0)的条件下,配制不同含水量(50%, 60%, 70%, 75%, 80%)的微乳液展开剂,考察含水量对主要黄酮类成分斑点迁移的影响。2个体系中几种黄酮类成分斑点的比移值随着微乳液含水量的减少而逐渐增加,展开时间也随之增长。含水量在 50%~75%时,各主要成分相互间的比移值差值随含水量的增加而显著变大,于 75%时达最大值;当含水量>75%时,比移值差值随含水量的增加而降低。当含水量为 50%~60%时,W/O型和O/W型微乳液展开时间缩短,斑点基本都能分离,但斑点有扩散现象,且个别比移值差值略有降低,分离效果不够理想。结合斑点效果和分离度等因素综合考虑,选择含水量75%的O/W型微乳液作为展开剂最为适宜。

2.7 有机改性剂考察

黄酮分子中多有酚羟基,调节展开系统为酸性更有利于层析行为。少量有机溶剂的存在,能增加表面活性剂对聚酰胺薄层的润湿程度,减少拖尾。故在含水量75%的微乳液中分别加入一定量甲醇、无水乙醇、甲酸、乙酸、乙酸乙酯、丙酮、乙酰丙酮,结果表明甲酸能较好地消除斑点的拖尾现象且展开时间较短,故甲酸最适合作为改性剂使用。使用5%甲酸为改性剂,可减少拖尾现象,使结果更清晰。

2.8 显色剂考察

黄酮类化合物常用显色剂为三氯化铝醇溶液,显色原理为黄酮类化合物分子中常含有5-OH,4-酮基,3-OH,4-酮基及邻二酚羟基这些结构单元,与Al³⁺生成黄色荧光络合物。此外还有氨水熏蒸、硫酸醇溶液、碘蒸气熏等方法。考察发现选择三氯化铝醇溶液为显色剂效果较好。

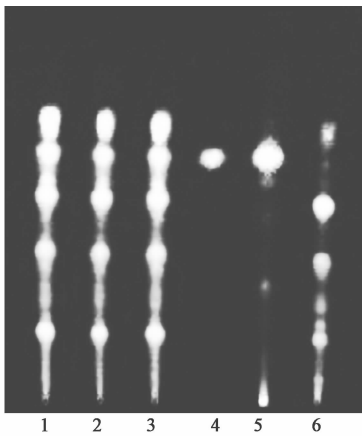
2.9 微乳薄层色谱鉴别

2.9.1 舒筋定痛胶

用毛细管吸取柚皮苷对照品溶液、骨碎补药材溶液、不同批次供试品溶液、阴性样品溶液适量,点于聚酰胺薄膜上,以含水量75%的微乳液[SDS-正丁醇-正辛烷(3.4:7.3:2.0)]为展开剂,室温下按一定方法展开,取出晾干,喷以1%三氯化铝醇溶液,置365nm紫外灯下检视,柚皮苷呈浅蓝色荧光斑点。见图1。

2.9.2 苏氏接骨胶

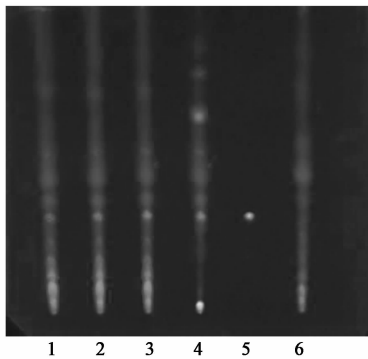
用毛细管吸取金丝桃苷对照



1. 供试品 20090819; 2. 供试品 20090907; 3. 供试品 20091030; 4. 柚皮苷对照品; 5. 骨碎补药材; 6. 阴性样品

图 1 舒筋定痛胶囊的微乳薄层色谱鉴别
Fig. 1 ME-TLC of Shujin Dingtong capsules

品溶液、菟丝子药材溶液、不同批次供试品溶液、阴性样品溶液适量, 点于聚酰胺薄膜上, 以含水量 75% 的微乳液 [SDS-正丁醇-正庚烷-水 (2.7:6.3:1.0)] 为展开剂, 室温下展开, 取出晾干, 喷以 1% 三氯化铝醇溶液, 置 365 nm 紫外灯下检视, 金丝桃苷呈亮黄色荧光斑点, 见图 2。与 2010 年版《中国药典》中方法比较, 微乳薄层色谱法能更好地分离样品中成分并改善拖尾现象。



1. 供试品 100329; 2. 供试品 100231; 3. 供试品 100015; 4. 菟丝子药材; 5. 金丝桃苷对照品; 6. 阴性样品。

图 2 苏氏接骨胶囊中黄酮类成分的微乳薄层色谱
Fig. 2 ME-TLC of flavonoids from Su's Jiegu capsules

3 讨论

本文选择不同组成、比例、含水量及酸度的微乳液为展开剂, 研究了苏氏接骨胶囊和舒筋定痛胶囊中黄酮类成分的薄层层析行为。确定的微乳液展开

剂与常规展开剂比较, 分离效果显著提高, 分离出的斑点数目大大增加, 且斑点清晰, 圆而集中, 不拖尾, 比移值 >0.8 的组分斑点不扩散, 比移值 <0.2 的组分仍能清楚辨认, 检测的灵敏度亦得以提高。曾试图对舒筋定痛胶囊中红花 (芦丁) 进行鉴别, 但由于样品组方复杂, 始终未能检测成功。但含水量 75% 的微乳液 [SDS-正丁醇-正辛烷 (3.4:7.3:2.0)] 对红药药材中的芦丁分离效果较明显, 斑点清晰圆整, 该方法较红花的传统鉴别方法有明显优势。

实验结果表明以 W/O 型微乳液为展开剂, 供试品色谱中斑点不规则且分离效果不好; 以油水双连续型微乳液为展开剂, 层析结果有所改善; 以 O/W 型微乳液为展开剂, 供试品中众多组分达到完全分离, 且斑点规则集中。此外, 菟丝子和骨碎补药材总黄酮以微乳薄层色谱法还分离出部分斑点。本文以微乳液为色谱流动相, 成功地用于传统医院制剂的分离鉴定, 操作简便、分离效果理想、检测灵敏, 为分离鉴定含黄酮类成分的药物提供了一种简便、准确、高效的分析方法, 为薄层色谱定量分析提供了较理想的分离手段。

[参考文献]

- [1] 崔淑芬, 林焕冰, 王小如, 等. 微乳薄层色谱法鉴别甘草的研究 [J]. 中草药, 2007, 38(4): 540-542.
- [2] 孙悦, 张茜, 毕静文, 等. 微乳薄层色谱用于糖分离的研究 [J]. 化学分析计量, 2010, 19(1): 74-76.
- [3] 高颖, 房德敏, 王巨存, 等. 苏氏接骨胶囊中骨碎补和菟丝子的质量控制 [J]. 中国医院药学杂志, 2010, 30(4): 333-335.
- [4] 李得堂, 张丽娟, 唐洪梅, 等. 微乳 TLC 应用于疗筋涂膜剂中分离鉴定的对比研究 [J]. 中成药, 2012, 34(2): 371-374.
- [5] 李琳, 刘志辉, 钱芳. 黄蜀葵花药材黄酮类成分的微乳薄层色谱定性鉴别研究 [J]. 中国新药杂志, 2009, 18(5): 451-453.
- [6] 安红丽, 欧阳五庆, 王俊, 等. 非离子型表面活性剂微乳的研制 [J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2007, 35(3): 65-69.
- [7] 刘根新, 张继瑜, 吴培星, 等. 不同助表面活性剂对药用微乳形成的影响 [J]. 中国医院药学杂志, 2009, 29(3): 177-180.

[责任编辑 刘德文]