

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2020.05.04

# 四味穿心莲散中大青叶的薄层色谱定性鉴别方法

班燕桃, 严明\*, 严寒, 单乃荣, 吴涛, 陈幸, 陈宝宇

(广西兽药监察所, 南宁 530001)

[收稿日期] 2020-01-17 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2020) 05-0025-05 [中图分类号] S859.79

**[摘要]** 建立了四味穿心莲散中大青叶的薄层色谱(TLC)定性鉴别法。以大青叶为对照药材, 采用环己烷-三氯甲烷-丙酮(4.8:9:0.5)为展开剂, 对四味穿心莲散中大青叶进行薄层色谱法鉴别。供试品色谱中, 在与对照药材薄层色谱相应的位置上, 分别显相同的蓝色斑点和浅紫红色斑点, 阴性对照无干扰。本方法简便、快速、准确, 重现性好, 可用于大青叶的质量控制。

**[关键词]** 四味穿心莲散; 大青叶; TLC; 质量控制

## TLC Identification of Isatidis Folium in Siwei Chuanxinlian San

BAN Yan-tao, YAN Ming\*, YAN Han, SHAN Nai-rong, WU Tao, CHEN Xing, CHEN Bao-yu

(Guangxi Supervisory Institute of Veterinary Drug, Nanning 530001, China)

**Abstract:** A TLC method for the qualitative identification of Isatidis Folium in Siweichuanxinlian San was establish. The Isatidis Folium of Siwei Chuanxinlian San was identified by TLC with the Isatidis Folium as the control material and cyclohexane chloroform acetone (4.8:9:0.5) as the developing agent. In the chromatogram of the test sample, the same blue spots and light amaranth spots were found at the corresponding positions of the chromatogram of the control drug, and the negative control had no interference. The method is simple, rapid, accurate and reproducible. It can be used for the quality control of Isatidis Folium.

**Key words:** Siwei Chuanxinlian San; Isatidis Folium; TLC; quality control

四味穿心莲散是由穿心莲、辣蓼、大青叶、葫芦茶四味中药材经粉碎、过筛、混匀制成的, 收载于《中华人民共和国兽药典》2015 年版二部的成方制剂, 具有清热解毒、除湿化滞的功能, 主要用于泄痢和积滞的治疗<sup>[1]</sup>。在目前的质量控制方法中, 收载了 3 味中药的显微特征鉴别和穿心莲的薄层鉴别方法。组方中的大青叶为十字花科植物菘蓝 *Isatis*

*indigotica* Fort. 的干燥叶, 主要化学成分为吲哚类、喹唑酮类、芥子苷类、有机酸类和氨基酸类化合物等<sup>[2]</sup>, 大青叶抗氧化活性成分主要集中在极性较低的化学组分中, 其主要有效成分为吲哚类、喹唑酮类和有机酸类化合物, 糖类和氨基酸类化合物的抗氧化活性较弱<sup>[3]</sup>。药理研究表明, 其具有较强的抗菌、抗病毒、增强机体免疫力、解热、抗炎、利胆等作

作者简介: 班燕桃, 理学学士, 从事兽药、兽药残留检测与研究。

通讯作者: 严明。E-mail: 1005955778@qq.com

用<sup>[4]</sup>。为了完善本产品的质量控制方法,提高产品质量,本文对组方中大青叶的薄层鉴别方法进行了研究。结果表明所建立的方法简单、快速、灵敏,可以作为该散剂的质量控制标准。

## 1 材料与方法

1.1 仪器 上海精密科学仪器有限公司 YP802N 电子天平,感量 0.01 g; KQ - 250DB 型数控超声波清洗器;微量移液器 5  $\mu$ L, 美国 Drummond Microcaps<sup>®</sup>微量毛细管;硅胶 G 薄层板(200 mm  $\times$  200 mm, MERCK 公司,批号:HX87777184);双槽玻璃层析缸。

1.2 试剂 大青叶对照药材(中国食品药品检定研究院,批号 121367 - 201403)、甲醇、环己烷、丙酮、三氯甲烷均为分析纯。

1.3 供试品 自配四味穿心莲散样品 1 批,从广西玉林市药材市场购进原料药材,按《中华人民共和国兽药典》2015 年版二部收录的药材标准检验符合规定。按成方制剂四味穿心莲散的处方投料,混合粉碎,过二号筛,混匀,即得。分别派员监制获得企业 A 样品,批号 20170901、20170902、20170903;企业 B 样品,批号 20171001、20171002、20171003;企业 C 样品,批号 20171201、20171202、20171203。

1.4 阴性对照样品 未添加大青叶的“四味穿心莲散”同供试品制法制得。

1.5 供试品溶液的制备 取供试品 2.5 g,加甲醇 30 mL,浸泡 30 min,超声 30 min,滤过,滤液蒸干,残渣加三氯甲烷 1 mL 溶解,作为供试品溶液。

1.6 对照品药材溶液的制备 取大青叶对照药材 0.5 g,加甲醇 30 mL,浸泡 30 min,超声 30 min,滤过,滤液蒸干,残渣加三氯甲烷 1 mL 溶解,作为对照药材溶液。

1.7 阴性对照溶液的制备 取不含大青叶的“四味穿心莲散”阴性对照样品 2.5 g,按照 1.5 项下的方法,制成阴性对照溶液。

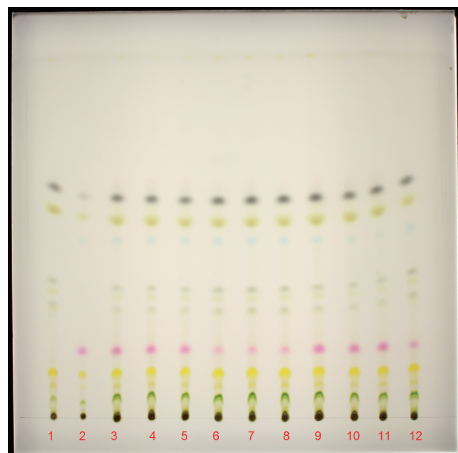
1.8 薄层鉴别与检视方式 吸取上述两种溶液各 5  $\mu$ L,分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以环己烷 - 三氯甲烷 - 丙酮(4:8:9:0.5)为展开剂,预饱和 30 min,展开,取出,立即观察。供试品色谱中,在

与对照药材色谱相应的位置上,分别显相同的蓝色斑点和浅紫红色斑点。

## 2 结果与分析

按兽用中药质量标准分析方法验证指导原则进行方法验证,结果如下。

2.1 重复性试验 采用 3 家企业各 3 批供试品,按 1.5 项下制成供试品溶液进行实验,图 1 实验结果表明该方法重复性好,溶液中待测成分稳定。



1. 阴性样品(缺大青叶) 5 $\mu$ L; 2. 大青叶对照药材 5 $\mu$ L;  
3 - 5. 企业 B 供试品(20171001、20171002、20171003) 5 $\mu$ L;  
6 - 8. 企业 A 供试品(20170901、20170902、20170903) 5 $\mu$ L;  
9 - 11. 企业 C 供试品(20171201、20171202、20171203) 5 $\mu$ L;  
12. 自制样品 5 $\mu$ L  
1. Negative sample without Isatidis Folium 5 $\mu$ L; 2. Isatidis Folium control herbs 5 $\mu$ L; 3 - 5. Test article of B factory (20171001、20171002、20171003) 5 $\mu$ L; 6 - 8. Test article of A factory (20170901、20170902、20170903) 5 $\mu$ L; 9 - 11. Test products of C factory (20171201、20171202、20171203) 5 $\mu$ L; 12. Self made sample 5 $\mu$ L

图 1 薄层板(MERCK)

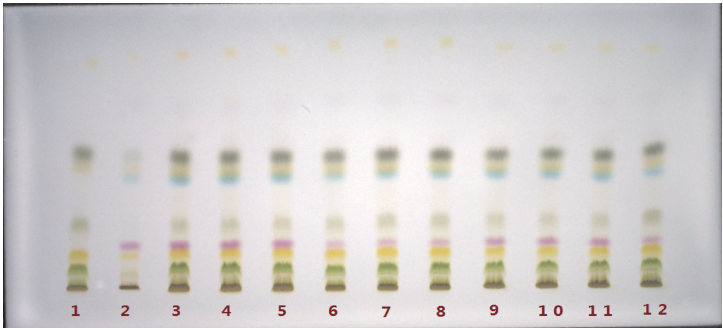
Fig 1 TLC (MERCK)

2.2 重现性试验 在不同实验室复核结果中,在使用规格为(100 mm  $\times$  200 mm)的薄层板时,青岛海洋化工厂分厂(批号 20160402)和烟台市化学工业研究所(批号 111218)的分离效果好,分别显相同的蓝色斑点和浅紫红色斑点,阴性无干扰(图 2、图 3),使用 MERCK 公司薄层板(批号 HX61216826)时,当上行展开 7 cm,存在斑点前沿稍滞后,靛玉红斑点分离良好,靛蓝斑点与其他斑

点有时不能完全分离,会影响结果判定(图 4),在实验时可适当伸长展距,得到良好的分离效果。

2.3 耐用性试验 此薄层色谱鉴别方法在相同来源不同批号(青岛海洋化工厂分厂:20170410、20180616、20181212)和相同规格(100 mm × 200 mm)不同来源的薄层板(手工铺制:20190220、青岛

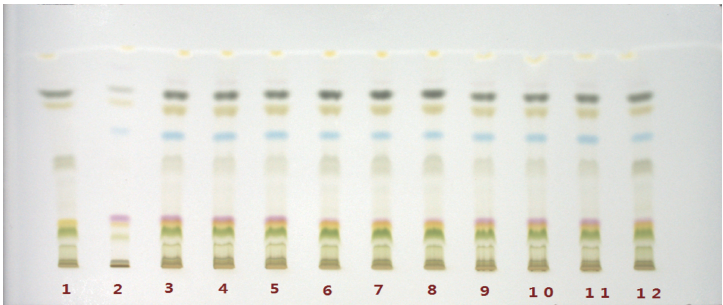
海洋化工厂分厂:20180616、烟台市化学化工研究所:20181109)上的分离效果相近,分别显相同的蓝色斑点和浅紫红色斑点,阴性无干扰。在不同温度、湿度条件下,色谱图的分离效果相近,表明该展开条件受温度湿度的影响较小,可靠性强。



1. 阴性样品(缺大青叶) 5 μL;2. 大青叶对照药材 5 μL;3-5. 企业 B 供试品(20171001、20171002、20171003) 5μL;  
6-8. 企业 A 供试品(20170901、20170902、20170903)5μL;9-11. 企业 C 供试品(20171201、20171202、20171203) 5 μL;  
12. 自制样品 5 μL;
1. Negative sample without Isatidis Folium 5 μL;2. Isatidis Folium control herbs 5 μL;3-5. Test article of B factory  
(20171001、20171002、20171003)5μL; 6-8. Test article of A factory(20170901、20170902、20170903)5μL;  
9-11. Test products of C factory (20171201、20171202、20171203) 5 μL;12. Self made sample 5μL

图 2 薄层板(青岛海洋化工厂分厂)

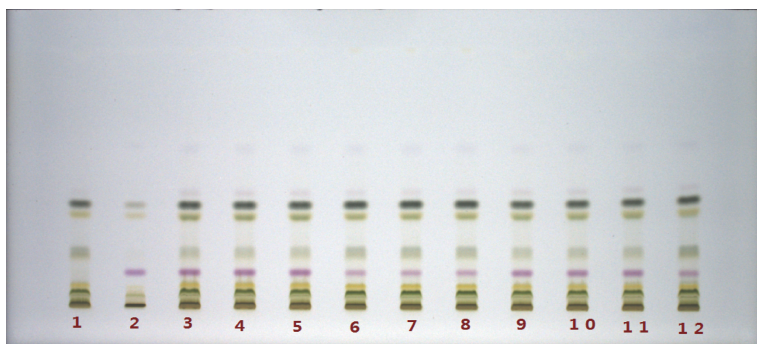
Fig 2 TLC (Qingdao Ocean Chemical Plant Branch)



1. 阴性样品(缺大青叶) 5 μL;2. 大青叶对照药材 5 μL;3-5. 企业 B 供试品(20171001、20171002、20171003) 5 μL;  
6-8. 企业 A 供试品(20170901、20170902、20170903)5μL;9-11. 企业 C 供试品(20171201、20171202、20171203) 5 μL;  
12. 自制样品 5 μL;
1. Negative sample without Isatidis Folium 5 μL;2. Isatidis Folium control herbs 5 μL; 3-5. Test article of B factory  
(20171001、20171002、20171003)5 μL;6-8. Test article of A factory(20170901、20170902、20170903)5μL;  
9-11. Test products of C factory(20171201、20171202、20171203)5 μL;12. Self made sample 5 μL

图 3 薄层板(烟台市化学工业研究所)

Fig 3 TLC (Yantai Institute of chemical industry)



1. 阴性样品(缺大青叶) 5  $\mu\text{L}$ ; 2. 大青叶对照药材 5  $\mu\text{L}$ ; 3-5. 企业 B 供试品(20171001、20171002、20171003) 5  $\mu\text{L}$ ;  
6-8. 企业 A 供试品(20170901、20170902、20170903) 5  $\mu\text{L}$ ; 9-11. 企业 C 供试品(20171201、20171202、20171203) 5  $\mu\text{L}$ ;  
12. 自制样品 5  $\mu\text{L}$

1. Negative sample without Isatidis Folium 5  $\mu\text{L}$ ; 2. Isatidis Folium control herbs 5  $\mu\text{L}$ ; 3-5. Test article of B factory  
(20171001、20171002、20171003) 5  $\mu\text{L}$ ; 6-8. Test article of A factory(20170901、20170902、20170903) 5  $\mu\text{L}$ ;  
9-11. Test products of C factory(20171201、20171202、20171203) 5  $\mu\text{L}$ ; 12. Self made sample 5  $\mu\text{L}$

图 4 薄层板(MERCK)

Fig 4 TLC (MERCK)

### 3 讨论与结论

**3.1 提取方法的优化** 按《中华人民共和国兽药典》2015 年版二部第 29 页中记载的大青叶薄层鉴别方法(2)进行验证, 色谱结果中供试品与对照药材相应的位置上, 展开结果靛蓝斑点位置上无干扰, 靛玉红斑点有黄绿色杂质干扰。在供试品溶液的制备方法中考察了不同溶剂、溶剂用量比例及提取方式: ①取样品加三氯甲烷超声提取, 滤过, 滤液蒸干, 三氯甲烷溶解作为供试品溶液; ②取样品加无水乙醇超声提取, 滤过, 滤液蒸干, 三氯甲烷溶解作为供试品溶液; ③取样品加甲醇超声提取<sup>[5]</sup>, 滤过, 滤液蒸干, 三氯甲烷溶解作为供试品溶液; ④取样品加甲醇浸泡<sup>[6]</sup>30 min 再超声提取, 滤过, 滤液蒸干, 三氯甲烷溶解作为供试品溶液。结果以方法④效果较好。选择甲醇作为本研究的提取溶剂, 主要考虑到用量比较大, 且甲醇属于低毒毒性, 稳定性良好, 而氯仿毒性较强, 也有文献报道靛玉红在氯仿溶剂中稳定性较差<sup>[7]</sup>, 同时也改善样品溶液的粘稠度, 易于点样。

**3.2 展开剂的优化** 展开剂考察中进行了苯-三氯甲烷-丙酮(5:4:1)<sup>[1,8]</sup>、苯-三氯甲烷-丙酮

(5:4:2)<sup>[9]</sup>、环己烷-三氯甲烷-丙酮-甲醇(5:8:0.5:1)、环己烷-三氯甲烷-丙酮-甲醇(5:8:1:1)、环己烷-三氯甲烷-丙酮(4:8:8:1)、环己烷-三氯甲烷-丙酮(4:8:9:0.5)等试剂不同配比试验研究, 因为苯的毒性大, 长期使用会对检测工作人员的身体健康造成危害, 也会对环境造成一定影响, 所以最终选择低毒的环己烷代替苯作为展开剂的一种。结果表明前五种配比试验样品斑点有干扰, 色谱分离度较差, 不予采用, 而以环己烷-三氯甲烷-丙酮(4:8:9:0.5)作为展开剂得到的色谱分离度及斑点相对位置重现性好。为避免产生边缘效应, 本展开剂系统应至少饱和半个小时, 展开时应保持密闭状态。

**3.3 薄层板的选择** 参照《中华人民共和国兽药典》中大青叶药材的薄层鉴别方法选择使用硅胶 G 薄层板, 在重现性实验中, 当使用规格为 100 mm × 200 mm MERCK 薄层板时, 出现影响结果判定的现象(图 4)。MERCK 板是进口产品, 购买时间较长, 相对其他板价格昂贵, 目前采用进口板的实验室相对比较少。而使用青岛海洋化工厂分厂和烟台市化学工业研究所薄层板时, 达到很好的分离效果,



重现性较好,阴性无干扰(图 2、图 3)。这两种板属于国内生产产品,在市面上容易购得,价格也比较实惠,可以降低分析成本,得到大多数实验室的青睐。虽有瑕疵,但对方法使用影响较小。

**3.4 对照药材的选择** 由于我国南北纬度、气候等因素差异较大,不同产地生产的大青叶外观品质和质量之间会有很大差异,从而引起有效成分种类和成分间配比的变化<sup>[10]</sup>。由于样品提取成分复杂,经实验分别采用大青叶对照药材与靛蓝、靛玉红对照品作为质控指标相比较,在薄层鉴别上采用大青叶对照药材作为质控指标产生靛蓝、靛玉红斑点大小合适,颜色清晰,专属性强,可同时解决复方组成药味的真伪(或有无)和优劣(或剂量)等问题,已达到质量控制的效果,所以选用大青叶对照药材为参照。由于靛蓝易氧化褪色,薄层板取出后应立即观察。

本研究建立了四味穿心莲散中大青叶的薄层色谱鉴别方法,说明四味穿心莲散的质量可控,且方法简便,方法专属性强,可为建立和完善四味穿心莲散中大青叶的质量标准提供依据。

## 参考文献:

- [1] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典 2015 年版二部 [S]. 北京:中国农业出版社.
- Commission of Chinese Veterinary Pharmacopoeia. Veterinary Pharmacopoeia of People's Republic of China (2015 Edition) Volume II [S]. Beijing: Chinese Agricultural Press.
- [2] 武彦文,高文远,肖小河,等. 大青叶的研究进展[J]. 中草药, 2006, 37(5): 793–796.
- Wu Y W, Gao W Y, Xiao X H, *et al.* Advances in studies on Folium Isatidis [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2006, 37(5): 793–796
- [3] 闫峻,顾娟,冯硕,等. 大青叶化学成分及抗氧化活性的研究 [J]. 质谱学报, 2019, 40(4): 383–389.
- Yan J, Gu J, Feng S, *et al.* Study of chemical constituents and antioxidant activity of Isatidis Folium [J]. Journal of Chinese

Mass Spectrometry Society, 2019, 40(4): 383–389.

- [4] 郑虎占,董泽宏,余靖. 中药现代研究与应用(1卷)[M]. 北京:学苑出版社, 1997: 323–324, 328–335.
- Zheng H Z, Dong Z H, She J. Modern study of traditional chinese medicine (Volume I) [M]. Beijing: Academe Press, 1997: 323–324, 328–335.
- [5] 蒋小文,吴启南,沈金辉. 大青叶中靛玉红提取方法的研究 [J]. 时珍国医国药, 2006, 17(4): 583–584.
- Jiang X W, Wu Q, Shen J H. Study on the extraction method of indirubin from Isatidis Folium [J]. Shizhen Medicine and Materia Medica Research, 2006, 17(4): 583–584.
- [6] 吕海涛,刘静,单虎,等. 正交实验法优选大青叶中靛蓝和靛玉红的提取工艺 [J]. 食品科技, 2011, 36(12): 246–250.
- Lv H T, Liu J, Shan H, *et al.* The optimization of extracting indigo and indirubin from dyers woad leaves by orthogonal experiment [J]. Food Science and Technology, 2011, 36(12): 246–250.
- [7] 王邦林,王强. 板蓝根、大青叶中靛玉红靛蓝的高效液相色谱分析 [J]. 天津药学, 1994, 6(3): 3.
- Wang B L, Wang Q. The analysis of high performance liquid in extracting indigo and indirubin from Isatidis Radix and Isatidis Folium [J]. Tianjin Pharmacy, 1994, 6(3): 3.
- [8] 陈建蓉,吴顺祥,杨俊华,等. 兽用“四味穿心莲散”中大青叶、穿心莲的薄层色谱鉴别研究 [J]. 中国动物保健, 2009, (5): 54–55.
- Chen J R, Wu S X, Yang J H, *et al.* Study on the TLC identification of Isatidis Folium and andrographis herba of veterinary [J]. China Animal Health, 2009, (5): 54–55.
- [9] 王林,陈献忠,马霞,等. 四味穿心莲超微粉的薄层鉴别研究 [J]. 中国兽药杂志, 2017, 51(2): 24–28.
- Wang L, Chen X Z, Ma X, *et al.* Study on the TLC identification of Siwei Chuanxinlian Ultra-Fine San [J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2017, 51(2): 24–28.
- [10] 董娟娥,梁宗锁,尉芹,等. 不同区域菘蓝根、叶(板蓝根、大青叶)有效成分含量差异 [J]. 应用生态学报, 2006, 17(9): 1613–1618.
- Dong J E, Liang Z S, Wei Q, *et al.* Effective constituents contents in indigowoad roots and leaves from different regions [J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2006, 17(9): 1613–1618.

(编辑:侯向辉)