

补骨脂酊中活性成分补骨脂素、异补骨脂素薄层色谱鉴别

王宇奇, 陈亚林*

毕节市第一人民医院药剂科, 贵州 毕节

收稿日期: 2023年8月19日; 录用日期: 2023年10月28日; 发布日期: 2023年11月3日

摘要

目的: 建立补骨脂酊中补骨脂素、异补骨脂素鉴别方法。方法: 采用薄层色谱法鉴别补骨脂酊中活性成分补骨脂素和异补骨脂素。结果: 采用正乙烷:乙酸乙酯(3:1)、上行展开方式、点样量为1~2 μl , 分离效果好, 斑点清晰, 操作简单快捷, 重现性好。结论: 通过分析影响薄层色谱鉴别因素, 优化补骨脂素、异补骨脂素薄层色谱鉴别方法, 为完善医疗机构制剂质量标准提供依据。

关键词

补骨脂酊, 薄层色谱法, 补骨脂素, 异补骨脂素

Thinlayer Chromatography Identificatin of Active Components Psoralen and Iso-Psoralen in Psoralen Tincture

Yuqi Wang, Yalin Chen*

Department of Pharmacy, The First People's Hospital of Bijie, Bijie Guizhou

Received: Aug. 19th, 2023; accepted: Oct. 28th, 2023; published: Nov. 3rd, 2023

Abstract

Objective: To establish the identification method of psoralen and isopsoralen in psoralen tincture. **Methods:** Active components, namely, Psoralen and isopsoralen, were identified by thin-layer chromatography. **Results:** Using n-hexane:ethyl acetate (3:1) as the mobile phase, ascending de-

*通讯作者。

velopment mode, and spot volume of 1~2 μl , good separation effect was achieved with clear and distinct spots. The method was simple, fast, and exhibited good reproducibility. Conclusion: By analyzing the factors affecting thin-layer chromatography identification, the identification method for psoralen and isopsoralen was optimized, providing a basis for improving the quality standards of pharmaceutical preparations in medical institutions.

Keywords

Psoralen Tincture, Thin Layer Chromatography, Psoralen, Isopsoralen

Copyright © 2023 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

医疗机构制剂是指医疗机构根据本单位临床需要, 经过批准而配制、自用的固定处方制剂[1], 是我国医疗机构特有的一种制剂形式。随着国家加大对中药管理的力度, 国家对中医药事业的重视和支持, 医疗机构制剂特别是经典处方的品种制剂有了广泛发展前景。医疗机构制剂具有临床使用方便、弥补市场缺乏制剂品种、医疗机构内部配制、价格相对较低等特点。特别是一些经典传统的中药配方, 疗效确切, 安全可靠, 经过经验丰富的老中医长期实践总结得出, 患者认可度高。医疗机构制剂对药品市场起到补充作用。医疗机构制剂可以发挥专科治疗特定病程的优势, 可以提高医疗机构诊治水平, 增强医疗机构间的竞争力。补骨脂酊是医疗机构制剂常用品种之一, 国内医疗机构如中日友好医院、深圳市中医院等均有补骨脂酊自制制剂。经过对我院皮肤科调研, 临床应用普遍, 我院申报补骨脂酊为医疗机构制剂。补骨脂酊是由豆科植物补骨脂成熟果实经过渗漉制成的酊剂, 出自《赵炳南临床经验集》。药用成分为补骨脂素和异补骨脂素, 补骨脂素能吸收紫外线, 对光敏感, 使用补骨脂素后, 其作用于完整的黑素细胞或未被完全破坏的黑素细胞, 增加酪氨酸酶活性, 促使黑素合成, 增强皮肤色素反应, 加快新生皮肤色素, 传递皮肤细胞代谢信息, 使受损细胞恢复[1] [2]。补骨脂酊具有调和气血, 活血通络, 润肤止痒, 生发祛白斑、能够发挥雌激素样[3]、抗骨质疏松[4]、抗血栓形成等作用[5]。临床用于治疗白癜风、扁平疣、斑秃、神经性皮炎、瘙痒症等, 也可用于皮肤细胞代谢障碍、自身免疫缺陷治疗[6]。临床上应用广泛, 胸腺肽联合复方补骨脂酊治疗白癜风、补骨脂酊联合梅花针、微波治疗斑秃、补骨脂酊联合温热疗法治疗跖疣等[7] [8] [9]。中国药典(2020版一部)采用薄层色谱鉴别法鉴别补骨脂素和异补骨脂素[10]。薄层色谱法(thin layer chromatography TLC)是一种快速分离、对微量物质定性分析的鉴别方法。兼顾柱色谱和纸色谱两种方法的优点, 适用于微量样品、挥发性小、较高温度易发生变化又不能用于气相色谱分析物质的分离。根据《医疗机构制剂注册管理办法(试行)》(局令第20号)[11]相关要求, 建立补骨脂酊中活性成分补骨脂素、异补骨脂素薄层色谱鉴别法, 为完善补骨脂酊质量标准控制提供依据。

2. 实验材料

2.1. 实验药品和材料

补骨脂中药材, 医院中药房提供, 批号: 20220219; 补骨脂酊: 医院制剂室自制, 批号: 20220318、

20220324、20220402; 补骨脂素对照品, 供含量测定, 中国药品生物制品检定所提供, 批号: 110739-201918, 异补脂素对照品, 供含量测定, 中国药品生物制品检定所提供, 批号: 110738-202016, 薄层层析硅胶板 G, 青岛海洋化工有限公司, 批号: 20220105。

2.2. 仪器及试剂

TES214S 电子天平赛多利斯德国, ZF-1S 三用红外线分析仪绍兴市苏珀仪器有限公司生产, HAD-720 超声波提取仪北京恒奥德仪器仪表有限公司, 多功能粉碎机, 广州市旭朗机械设备有限公司。数显恒温水浴锅, 绍兴市景迈仪器设备有限公司。实验试剂乙醇 75%、正己烷、乙酸乙酯、甲醇、乙醚、氢氧化钾等试剂, 均为分析纯, 水为纯化水。

3. 鉴别方法

3.1. 对照品溶液制备

取补骨脂素、异补骨脂素对照品适量, 加乙酸乙酯分别制成浓度为 1 mg/ml 的溶液, 作为对照品溶液。

3.2. 供试品溶液制备

取补骨脂药材 300 g, 粉碎过 80 目筛, 制成粗粉, 用 75%乙醇适量润湿 30 min 后浸泡 72 小时, 滤过, 滤液分装即得补骨脂酊。取本品适量(约相当于补骨脂 0.3 g)加乙酸乙酯 10 ml, 超声处理 10 min, 置水浴锅上蒸干, 残渣加乙酸乙酯 1 ml 溶解, 作为供试品溶液。

3.3. 薄层色谱试验

3.3.1. 展开剂选择

根据《中国药典》2020 版及相关文献对展开剂进行预试验。选择乙醚 - 乙酸乙酯(4:1)为展开剂, 将样品点于同一硅胶 G 薄层板上, 对照品与被测样品未分开, 分离效果差, 有拖尾; 更换乙醚 - 乙酸乙酯比例为 2:1 时, 补骨脂素和异补骨脂素两种组分基本未分开。选择正己烷 - 乙酸乙酯(2:1)为展开剂时, 虽然被测组在薄层板上相应位置显示相同斑点, 但分离效果较差, 拖尾严重。选择正己烷 - 乙酸乙酯 3:1 为展开剂时, 将样品点于同一硅胶 G 薄层板上, 分离效果好, 斑点清晰, 无拖尾。通过几种展开剂的试验, 最后确定展开剂为正己烷 - 乙酸乙酯 3:1。

3.3.2. 展开距离、点样量的选择

展开距离的选择对被测组分有较大的影响。展开距离小, 被测组分未分开, 展开距离过大, 被测组分在相同的位置上显示的斑点不一致, 一般选择展开距离为 10 cm。点样量的大小对斑点影响较大, 点样量过大, 斑点虽然清晰, 但会把其他物质包裹在内, 对被测组分有影响, 点样量过小, 斑点显示不清晰, 不能将被测组分分离。一般点样次数 3~4 次, 点样量约为 1~2 μl 。斑点分离清晰, 分离效果好, 无拖尾。

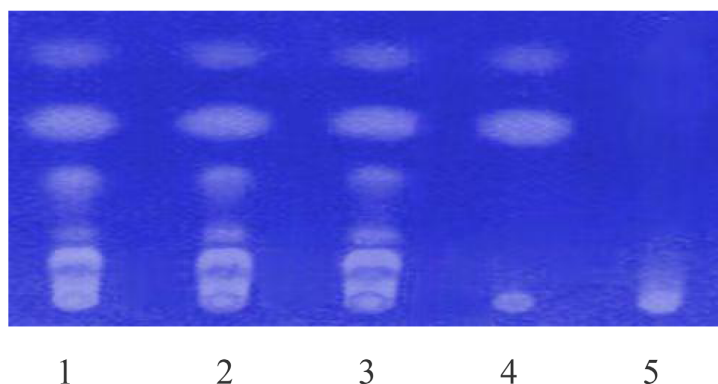
3.3.3. 展开方式的选择

展开方式对分离组分也有影响。本试验选择了上行展开方式、径向展开方式、双向展开方式等, 除上行展开方式外, 其余方式展开的效果差, 影响被测组分的分离, 且有拖尾现象。故测定补骨脂素、异补骨脂素的薄层色谱方法为: 展开剂为正己烷 - 乙酸乙酯 3:1, 上行方式展开, 点样量为 1~2 μL 。具体操作: 照薄层色谱法《中国药典》2020 年版四部薄层色谱法, 吸取上述三种溶液各 1~2 μL 分别点于同一硅胶 G 薄层板上, 以正己烷 - 乙酸乙酯(3:1)为展开剂, 展开, 展距 10 cm, 取出, 晾干, 喷以 10% 氢氧

化钾甲醇溶液, 置紫外灯下(365 nm)下检视, 供试品溶液在与对照品溶液相应的位置上, 显相同的蓝白色荧光斑点。另取本品 1 滴, 点于滤纸上, 置紫外灯下观察, 显黄绿色荧光。上行展开方式是一种使用最广泛的薄层色谱展开方式, 较其他展开方式相比具有操作简单, 节约展开剂, 便于预饱和, 适合含有粘附剂的硬薄层板。

4. 结果

供试品色谱中, 在与对照品色谱相应的位置上, 显示相同颜色的蓝白色荧光斑点, 阴性样品溶液在相应位置上无干扰。可以为完善补骨脂酊质量控制标准提供依据。薄层色谱结果分析: 专属性好, 阴性对照无干扰, 三批供试品斑点清晰。重复性好, 多批样品进行薄层色谱鉴别, 斑点显示相同位置, 无拖尾。结论: 本薄层色谱法专属性、重复性符合要求, 见图 1。



1、20220318 样品；2、20220324 样品；3、20220402 样品；4、补骨脂素、异补骨脂素对照品；5、阴性对照品

Figure 1. Upland development method, development agent of n-hexan-ethyl acetate (3:1), development distance of 10 cm thin layer chromatography

图 1. 上行展开方式、展开剂为正己烷 - 乙酸乙酯(3:1)、展开距离为 10 cm 薄层色谱图

5. 影响薄层鉴别因素分析

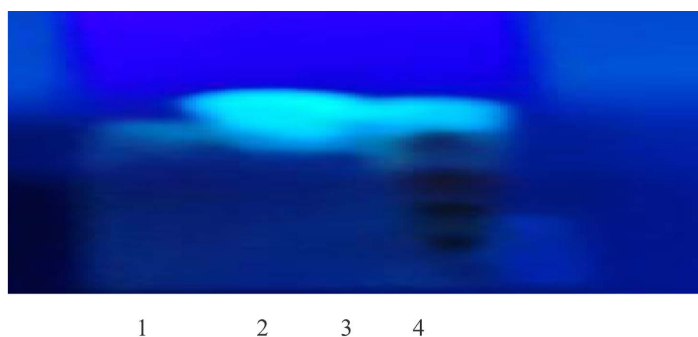
作为医疗机构制剂, 补骨脂酊质量控制尤为重要, 补骨脂酊在薄层鉴别时影响因素较多, 现对此进行分析。

5.1. 展开剂的影响

展开剂是指用来分离不同极性的两种物质的溶剂, 展开剂的选择对提取分离具有重作用。根据分离物质极性, 选择不同比例的展开剂。展开剂比例的选择依据参考文献及所要分离化合物的极性进行预试验。不同比例的展开剂对化合物分离效果不同。使用展开剂时最好新鲜配制。展开剂对分离化合物成分易溶解, 容易分开鉴别成分, R_f 在 0.3~0.8 之间, 展开剂与所鉴别成分不发生化学反应, 适宜的沸点, 比较小的黏度, 展开后鉴别成分的斑点圆且集中。补骨脂素、异补骨脂素属于呋喃香豆素类化合物, 易溶于甲醇、乙醇、三氯甲烷和乙醚。故展开剂选用乙醚 - 乙酸乙酯(4:1), 展开后对照品斑点及样品斑点未分离开、拖尾。乙醚分子虽然含有极性较大的碳氢键, 但由于氧原子的两端均与碳相连, 整个分子的极性不大, 选择乙醚 - 乙酸乙酯(4:1)为展开剂时分离效果差, 有拖尾。更换二者比例为 2:1 时, 对被分离组分基本分不开。用正己烷 - 乙酸乙酯(2:1)时, 虽然被测组在薄层板上相应位置显示相同斑点, 但分离效果较差, 拖尾严重。使用正己烷 - 乙酸乙酯 3:1 为展开剂时, 分离清晰, 无拖尾。展开剂的选择对分离物质的影响比较大, 根据分离物质的理化性质等多种因素进行选择。见图 2。

5.2. 展开距离、点样量影响

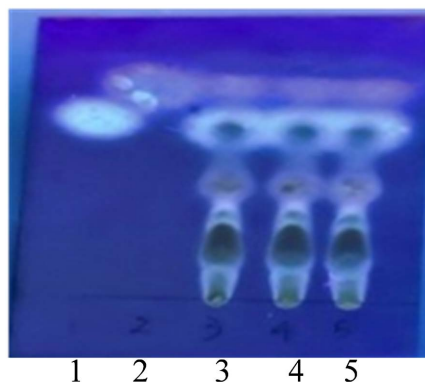
样品点在薄层板上后放入展开缸中, 加入配置好的展开剂, 由于鉴别化合物中各个组分的理化性质不同, 在展开缸中移动距离不一致, 展开一定距离后, 在薄层板上显示不同分离组分的不同斑点。喷以显色剂使鉴别组分在薄层色谱板固定位置上显示不同的斑点, 根据鉴别组分的紫外光波在不同波长下显示荧光斑点观察被分离的组分, 与对照品显示的斑点比较, 确定所鉴别的组分。选择展开距离时根据薄层粒度大小来确定, 薄层粒度越小, 展开距离要缩短, 一般不超过 10 cm, 否则由于色谱扩散从而影响鉴别物质的分离效果。比移值(Rf)代表被分离组分移动的特点, 通常用组分在薄层色谱板上斑点显示的位置来表示。不同组分的 Rf 值不同, 代表不同组分的特性, 当实验条件如展开剂、展开条件、固定相、流动相固定时, 可以利用 Rf 值对被测组分进行定性鉴别。实际工作中将被测组分与对照品同时点在薄层色谱板上后放入展开缸展开, 比较被测物质与对照品移动情况, 进行定性分析。较多的点样量对分离效果有影响, 斑点直径较大, 不规则, 视觉效果比较差, 较少点样量, 斑点显示不清晰, 用毛吸管吸取样品, 轻轻点于薄层板上, 待样品自然干燥后, 再点一次, 连续点 3~4 次即可, 点样次数过多, 斑点显示不规则, 连续拖尾, 适当的点样量有利于薄层板的显色[12]。见图 3。



1、补骨脂素、异补骨脂素对照品; 2、20220318 样品; 3、20220324 样品; 4、20220402 样品

Figure 2. Thin layer chromatogram influenced by development agent

图 2. 展开剂影响的薄层色谱图



1、补骨脂素、异补骨脂素对照品; 2、20220318 样品; 3、20220324 样品; 4、20220402 样品

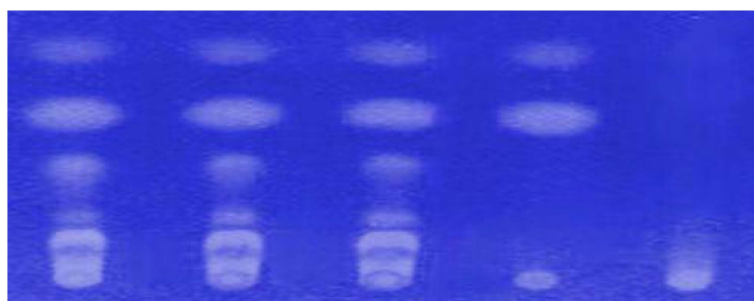
Figure 3. Thin layer chromatogram with influence of sample size

图 3. 点样量影响的薄层色谱图

5.3. 展开方式的影响

本试验采用上行法展开方式。上行法就是将适量展开剂加入展开缸中, 将点好样品的薄层色谱板垂

直或倾斜放置展缸中, 被分离组分在溶剂的作用下沿着薄层板底端自下向上展开的鉴别方法; 下行法是将样品点到滤纸上放入装好展开剂的展开缸中, 使被测组分在溶剂的作用下自上向下移动, 下行法的展开速度较上行法快; 平行展开是指将薄层板放在水平位置, 展开剂被吸附至薄层板点有样品的一端进行展开; 径向展开就是将样品点在圆形薄层板的圆心附近, 使溶剂自圆心向圆四周方向移动; 分离 R_f 值大的组分适合选择向心展开方式; 而对较难分离的组分更适合选择径向展开方式; 双向展开是指将样品点在薄层板一角, 沿着薄层板底边进行展开, 取出薄层板使展开剂挥发, 将薄层板旋转 90° , 沿着另一底边进行展开, 双向展开适用于成分复杂、性质相似难分离的化合物。多次展开和双向展开具有操作方便、分离设施简单、各分离组分斑点清晰、被测组分分离时间短、同一薄层板上可分离多种化合物的优点。不同的展开方式适合不同组分的分离, 根据分离组分的性质选择适当的展开方式。当展开剂在薄层板上展开时, 接近薄层板上缘近 0.5 cm 时, 将薄层板取出, 晾干, 喷以显色剂显色。本实验采用上行展开方式展开, 效果较好, 被分离斑点清晰, 无干扰。具体色谱图见图 4、图 5。



1、20220318 样品; 2、20220324 样品; 3、20220402 样品; 4、补骨脂素、异补骨脂素对照品; 5、阴性

1、20220318 样品; 2、20220324 样品; 3、20220402 样品; 4、补骨脂素、异补骨脂素对照品; 5、阴性

Figure 4. Upland development method, development agent of *n*-hexan-ethyl acetate (3:1), development distance of 10cm thin layer chromatography

图 4. 上行展开方式、展开剂为正己烷 - 乙酸乙酯(3:1)、展开距离为 10 cm 薄层色谱图



1 2 3 4

1、补骨脂素、异补骨脂素对照品; 2、20220318 样品; 3、20220324 样品; 4、20220402 样品

Figure 5. Thin layer chromatogram influenced by other development modes

图 5. 其他展开方式影响的薄层色谱图

6. 讨论

综上所述, 补骨脂素和异补骨脂素是同分异构体, 化学结构相似, 分离时存在一定困难。对于使用薄层色谱法鉴别化合物时, 薄层板、展开剂的选择、展开剂比例、展开方式、点样量、显色剂喷洒是否均匀等因素都会影响化合物的分离效果。根据分离化合物的性质, 综合考虑各种影响因素, 选择合适的展开剂, 进行分离, 减少其他因素的干扰。补骨脂酊为医院临床验方, 在医院临床使用多年, 疗效确切,

因其是医疗机构制剂, 没有统一的质量控制标准, 通过建立补骨脂酊薄层色谱法鉴别方法, 为完善医疗机构制剂质量标准提供了依据, 该方法重复性良好, 可较好地控制医疗制剂的质量。中药制剂的多成分定性鉴别及含量测定对制剂质量控制具有重要意义[13]。

基金项目

毕科联合字 sy[2018]4 号《补骨脂酊制备工艺优化及质量标准研究》。

参考文献

- [1] 陈家润, 沈小莉, 王晓英, 等. 广东省医疗机构化学药制剂注册申报存在的问题及建议[J]. 中国药房, 2019, 30(22): 3030-3034.
- [2] 翟远坤, 潘亚磊, 牛银波, 等. 补骨脂素与异补骨脂素对乳鼠颅骨成骨细胞分化成熟影响的比较研究[J]. 中国药理学通报, 2012, 28(3): 355-361.
- [3] 王来友, 若埃尔·米叶, 杨得坡. 补骨脂素 PLGA 纳米粒的制备及对人体皮肤的渗透特性[J]. 中国药学杂志, 2008, 43(17): 1317-1321.
- [4] 林桂涛, 李荣伟, 耿子凯, 等. 补骨脂水及乙醇提取物雌激素样作用的比较[J]. 中成药, 2016, 38(12): 2688-2691.
- [5] 金剑飞, 何维英, 孙可, 等. 补骨脂水提取物对去卵巢骨质疏松大鼠肾脏组织中 TGF- β 1/Smad4 信号通路转导的影响[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2020, 28(6): 1-5.
- [6] 李笑甜, 宋忠臣. 补骨脂及其活性成分免疫调节作用研究进展[J]. 现代免疫学, 2017, 37(1): 80-83.
- [7] 张盼. 胸腺肽联合复方补骨脂酊治疗白癜风的疗效分析[J]. 中国冶金工业医学杂志, 2021, 38(5): 585-586.
- [8] 郭奕好, 杨登科, 肖云, 等. 补骨脂酊联合梅花针、微波治疗斑秃 35 例[J]. 广西中医药大学学报, 2018, 21(2): 49-51.
- [9] 吴苗, 曹毅, 杨晓红, 等. 补骨脂酊联合温热疗法治疗跖疣的相关研究[J]. 中华中医药杂志, 2015, 30(12): 4475-4477.
- [10] 国家药典委员会编. 中国药典[M]. 第一部. 北京: 中国医药科技出版社, 2015.
- [11] 国家食品药品监督管理局. 医疗机构制剂注册管理办法: 试行[S]. 局令第 20 号, 2005-06-22.
- [12] 马音, 李天平, 杨梅. 中药薄层鉴别研究经验谈[J]. 现代医药卫生, 2006, 22(11): 1720-1721.
- [13] 李曙光, 刘志承, 曹丽萍, 等. 复方补骨脂酊的定性定量方法研究[J]. 中南药学, 2017, 15(12): 1771-1774.