DOI:10.3969/j.issn.1000-9760.2020.01.003

绵马贯众薄层色谱指纹图谱的研究*

刘　乙　马　瑜　殷　澳　聂其婷　任　强△
（济宁医学院药学院，日照 276826）

摘　要　目的　建立薄层色谱指纹图谱和抗氧化活性筛选对绵马贯众进行定性分析及其质量评价。**方法**　通过对来自 19 家药店绵马贯众的形状、大小、颜色、气味、切面、粉末等特征确定其真伪。将绵马贯众药材粉碎，加环己烷超声处理，离心后取上清液备用。薄层板经 pH7.0 的磷酸二氢钠-柠檬酸缓冲液加维生素 C 1.2g 摇匀浸渍改性后点样。展开剂正己烷-三氯甲烷-甲醇（30∶15∶1）展距 9cm，建立薄层色谱指纹图谱。最后对其进行抗氧化实验，观察不同批次绵马贯众在抗氧化方面的差异。**结果**　性状鉴别、显微鉴别均显示所购药材均为绵马贯众真品，薄层色谱指纹图谱显示 1～19 号样品质量有较大差异，其中 6、7、10 号几乎无特征斑点，14 号斑点颜色较浅。绵马贯众甲醇提取液对 DPPH 及 FRAP 的清除率显示，绵马贯众有较好的抗氧化活性。**结论**　不同药店购买的绵马贯众药品质量有较大差异，6、7 和 10 号样品为不合格样品，可能受到产地、加工或存储时间的影响。

关键词　绵马贯众；TLC；DPPH；FRAP
中图分类号：R282.4　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：1000-9760（2020）02-010-04

Study on TLC fingerprint of *Dryopteris crassirhizoma* in different drugstores

LIU Yi, MA Yu, YIN Ao, NIE Qiting, REN Qiang
(*College of Pharmacy, Jining Medical University, Rizhao* 276826, *China*)

Abstract: ***Objective***　To establish a TLC fingerprint and antioxidant activity screening for qualitative analysis and quality evaluation of *Dryopteris crassirhizoma*e. ***Methods***　Authenticity was determined by the shape, size, color, smell, section, and powder characteristics from 19 pharmacies of *Dryopteris crassirhizoma*. *Dryopteris crassirhizoma* crushed with cyclohexane ultrasonic treatment was centrifuged and the supernatant was spared. The sample was impregnated on the TLC plate modified by pH7.0 sodium di-hydrogen phosphate citric acid buffer plus vitamin C1.2 g. Developing agent was n-hexane, chloroform, methanol (30∶15∶1) and the spread distance was 9cm. ATLC fingerprint was established. Finally, *Dryopteris crassirhizoma* of different sources were observed through their difference antioxidant abilities. ***Results***　Macroscopic and microscopic identification showed that the purchase of Chinese medicinal materials were genuine *Dryopteris crassirhizoma*. TLC fingerprints showed that there was difference among the sample 1-19 quality, and sample 6, 7 and 10 was almost no characteristic spots as well as sample 14 with lighter in color characteristic spots. The ethanol extract of *Dryopteris crassirhizoma* to remove DPPH and FRAP showed that it had good antioxidant activities. ***Conclusion***　There is a great difference in traditional Chinese medicine quality of different pharmacy sources *Dryopteris crassirhizoma*. The unqualified samples 6, 7, and 10 might be influenced by production, processing or storage time.

Keywords: *Dryopteris crassirhizoma* Nakai; Thin layer chromatography; 2, 2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl; Ferric reducing antioxidant power

*［基金项目］济宁医学院大学生创新创业训练计划资助项目（cx2015060）；国家级大学生创新创业训练计划资助项目（201510443004）
△［通信作者］任强，E-mail：renqiang@ mail.edu.cn

绵马贯众为鳞毛蕨科植物粗茎鳞毛蕨(*Dryopteris crassirhizoma* Nakai)的干燥根茎及叶柄残基。绵马贯众收录于 2015 年版《中国药典》,主产于河北、内蒙古、东北三省等中国北方地区。具有清热解毒、杀菌驱虫、止血等功效[1]。药理研究表明,绵马贯众对痢疾杆菌、伤寒杆菌、大肠杆菌、绿脓杆菌、变形杆菌等具有较强的抑制作用,对金葡菌亦有抑制作用。绵马贯众主要成分是间苯三酚类化合物,这类化合物具有明显抗癌活性,此外还包括黄酮类、酚酸类、萜类、甾体类、苯丙素类、脂肪族类等化合物[2-6]。绵马贯众药理作用方面的研究较多,主要集中在抗病毒、抗菌、抗肿瘤、抗疟疾、驱虫等方面[7-8]。由于绵马贯众中的主要化学成分间苯三酚类物质化学性质不稳定,长期存放会导致绵马贯众的质量和药效发生变化。为了更好地评价和控制不同药店出售的绵马贯众质量,本实验建立了绵马贯众薄层色谱指纹图谱,并对其进行 DPPH 和 FRAP 抗氧化活性测定,期望达到快速、简便地判断绵马贯众质量的目的。

1　实验材料

1.1　仪器

生物显微镜 B204LED(重庆奥特光学仪器有限责任公司);数控超声波清洗器(Q-500DB 型);CP224C 型电子天平(奥豪斯仪器常州有限公司);TGL-185 台式高速冷冻离心机(长沙平凡仪器仪表有限公司);紫外-可见分光光度计(UV-5100 型);数控超声波清洗器(Q-500DB 型);XW-80A 旋涡混合器(上海精科实业有限公司)。

1.2　试剂

抗坏血酸(纯度大于 99%,北京百灵威科技有限公司);柠檬酸(分析纯,天津市凯通化学试剂有限公司);磷酸氢二钠(国药集团化学试剂有限公司);正己烷(分析纯,天津市富宇精细化工有限公司);三氯甲烷(分析纯,天津市富宇精细化工有限公司);1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH,SIGMA-ALDRICH 试剂公司,批号:STBD4147V);2-(N-吗啡啉)乙磺酸(TPTZ,SIGMA-ALDRICH 试剂公司,批号:LH60Q12);2,6-二叔丁基-4-甲基苯酚(北京百灵威科技有限公司,批号:LS20R82)。

1.3　药材

绵马贯众药材购买自 19 家不同药店,购买地及产地信息详见表 1。

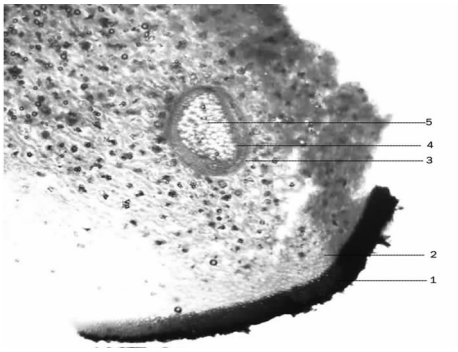
表 1　绵马贯众的购买药店、产地和购买地区

编号	药店	产地	购买地
1	瑞丰药店	黑龙江	滨州
2	同方医院	贵州	青岛
3	新民众大药房	亳州	山西
4	众康医药	吉林省	淄博
5	百草中药堂	辽宁	山西
6	中石医药	亳州	淄博
7	齐鲁医药	黑龙江	淄博
8	方正医药	吉林	滨州
9	同仁康大药房	河北	山西
10	济生堂大药房	亳州	山西
11	圣济堂大药房	辽宁	滨州
12	润生堂大药房	黑龙江	日照
13	紫光大药房	黑龙江	日照
14	中邮医药	河北	滨州
15	北京同仁堂	辽宁	山西
16	宏仁堂医药	黑龙江	淄博
17	百草益堂	辽宁	沈阳
18	国大药房	不详	临沂
19	国药堂	不详	临沂

2　方法与结果

2.1　显微鉴别

选择完整绵马贯众根茎,蒸馏水浸泡 30min 后切薄片,水合氯醛透化,在载玻片上滴一滴甘油,盖好盖玻片,分别置于 10 × 和 40 × 物镜下观察。壁组织由数层厚壁细胞组成,棕色至深棕色。基本组织薄壁细胞排列疏松,含有黄棕色物和淀粉粒。叶迹维管束散在于基本组织外侧。分体中柱周韧型,5 ~ 13 个排列成环;每个外围有一层内皮层细胞,凯氏点明显。木质部由多角形管胞组成。间隙腺毛存在于细胞间隙,多破碎叶柄基部:厚壁组织由几层厚壁细胞组成,棕色至深棕色。基本组织薄壁细胞排列疏松,含有黄棕色物和淀粉粒。绵马贯众横切面如下图 1 所示。



注:1. 厚壁组织;2. 基本组织;3. 内皮层;4. 韧皮部;5. 木质部

图 1　绵马贯众横切面

2.2 粉末鉴别

绵马贯众样品，粉碎，取适量置于载玻片上，滴加水合氯醛透化，盖好盖玻片。置于目镜 10 × 和 40 × 下观察。厚壁细胞单个散在或成束，黄棕色或棕色，纤维状，直径 6 ~ 42 μm。间隙腺毛单细胞，多破碎，偶见完整者，椭圆形或长卵圆形，基部延长，有的含有黄棕色分泌物。管胞主要为梯纹，少数为网纹，直径 7 ~ 43 μm。见图 2。

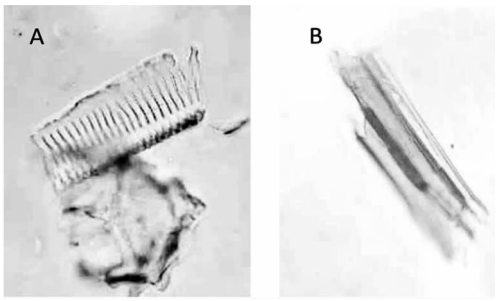


图 2　绵马贯众粉末中管胞(A)和厚壁细胞(B)

2.3 薄层色谱法

2.3.1 供试品溶液的制备　取绵马贯众药材，粉碎，过筛(60 目)，精密称取 0.25g，加环己烷 20ml，超声处理(140W) 30min，12000rpm/min 离心 10min，取上清液 2ml，置通风橱下挥干，加三氯甲烷 1ml 溶解，即得供试品溶液。

2.3.2 薄层板浸渍改性　配制柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液(pH 7.0)200ml，加维生素 C 1.2g 放置棕色容量瓶中溶解摇匀，即得改性溶液。将改性溶液均匀喷涂到薄层板上，放于 40℃ 烘箱中烘干备用，注意暗处操作防止氧化变色。

2.3.3 点样、展开以及显色检视　点样量 4μl，条带状点样，条带宽度 6mm，条带间距 5mm，原点距底边 1cm。展开剂为正己烷-三氯甲烷-甲醇(30∶15∶1)，取 20ml 倒入双槽展开缸内。薄层板预饱和 2h 以上后展开，展距 9cm。展开后喷以 0.3% 坚牢蓝 BB 盐稀乙醇溶液，40℃ 放置 1h。注意暗处操作，最后置可见光下检视。

2.3.4 薄层色谱指纹图谱　可见光下观察斑点清晰、完整、不拖尾，无边缘效应，Rf 值大小符合要求，1 ~ 19 号样品质量有较大差异，其中 6、7、10 号几乎无特征斑点，14 号斑点颜色较浅。见图 3。

2.4 抗氧化活性实验

2.4.1 供试品溶液的制备　精密称定绵马贯众 0.1g，置 10ml 离心管中，加 70% 乙醇 10ml，浸泡 30min，超声 30min(W = 85%，T = 35℃)，取上清液，12000rpm/min 离心 10min 即得取 10mg/ml 的样品溶液，取 500μl 加 70% 乙醇稀释到 1ml 稀释成 5mg/ml 的溶液，即得供试品溶液。

2.4.2 DPPH 自由基清除活性的测定　精密称取 5mg DPPH，溶于 125ml 的色谱甲醇中，配成 100μM 的 DPPH 甲醇溶液，现用现配。取供试品溶液 10μl 加入 2ml 的 DPPH 甲醇溶液中，室温下避光放置 60min，甲醇做空白，在 517nm 下测定吸光度。DPPH 清除率通过以下公式计算：$[(A_0 - A_1)/A_0] \times 100\%$。$A_0$ 是指不加样品时，DPPH 甲醇溶液的吸光度，这里的 A_1 是加入样品反应后混合溶液的吸光度[9-10]。19 个批次绵马贯众对 DPPH 的清除能力如图 4 所示。

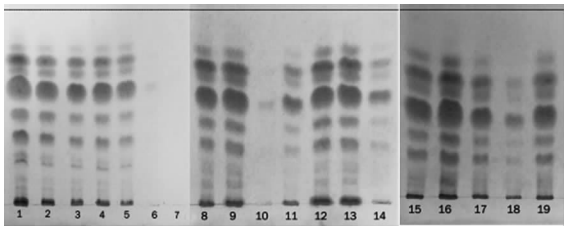


图 3　绵马贯众薄层色谱指纹图谱

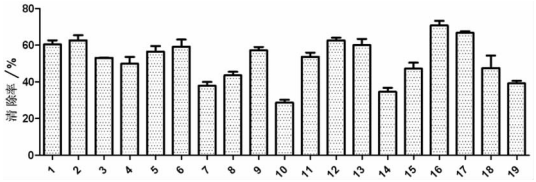


图 4　绵马贯众对 DPPH 的清除能力

以 BHT 做标准曲线，以不同浓度 BHT 作横坐标，以清除率作纵坐标，绘制标准曲线得出回归方程。DPPH 法中每百克绵马贯众抗氧化能力相当于多少 gBHT 如图 5 所示。

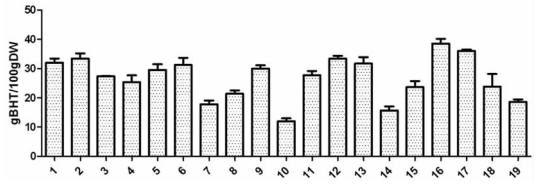


图 5　绵马贯众每百克抗氧化能力

2.4.3 铁离子还原/总抗氧化能力(FRAP)的测定　精密称取 TPTZ 0.156g，溶于 50ml 40mM 的盐酸中，配成 10mM 的 TPTZ 溶液。精密称取 g 三氯化铁 0.27，溶于 50ml 水中，配成 20mM 的三氯化铁溶液。量取冰醋酸 8ml，称取无水醋酸钠 0.8g，放入容量瓶中定容到 500ml，配成 pH3.6，浓度为

0.3mol/L 的醋酸缓冲溶液。TPTZ 溶液，三氯化铁溶液，醋酸缓冲溶液三者按 1∶1∶10 的比例混匀，水浴 30min，现用现配制，配成 FRAP 工作液。取 10mg/ml 的供试品溶液 100μl，加入 2ml FRAP 工作液中，避光放置 60min 后，以醋酸缓冲溶液作空白，在 593nm 下测吸光度。铁离子的还原能力可以用吸光度的大小来表示，吸光度越大则还原三价铁的能力越强，即样品的抗氧化能力越强[11]。FRAP 法中不同批次绵马贯众铁离子还原能力如图 6 所示。

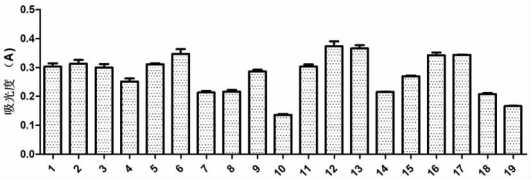


图 6　不同批次绵马贯众铁离子还原能力

以 BHT 作标准曲线，BHT 的浓度作横坐标，吸光度作纵坐标，得出回归方程，换算每 100g 绵马贯众的抗氧化能力相当于多少 gBHT，结果如图 7 所示。

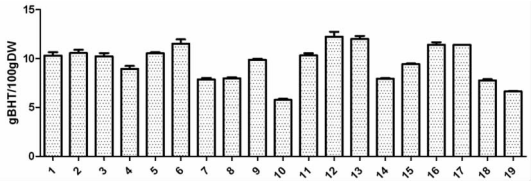


图 7　每百克绵马贯众抗氧化能力

2.4.4　对提取溶剂的考察　DPPH 法和 FRAP 法，对绵马贯众醇提物的抗氧化作用进行评价，DPPH 法和 FRAP 法中每百克不同产地绵马贯众抗氧化能力相当于多少 gBHT 比较如图 8 所示。

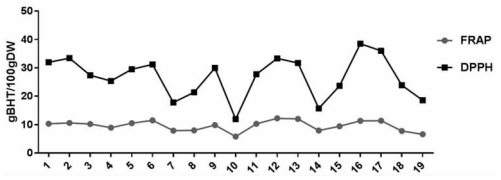


图 8　DPPH 法和 FRAP 法抗氧化作用对比结果

3　讨论

建立了绵马贯众薄层色谱指纹图谱，显色后可见光下观察斑点清晰、完整、不拖尾，无边缘效应，Rf 值大小符合要求。绵马贯众乙醇提取物对 DPPH 自由基清除活性以及铁离子还原能力的趋势基本一致。此外，抗氧化活性测定的结果与薄层色谱指纹图谱的结果有一定的相关性，其中 6、7、10 和 14 号样品斑点颜色较浅，推测可能含有较少的间苯三酚类成分，故此抗氧化活性结果也可以判定质量优劣，说明长时间放置绵马贯，其间苯三酚类成分可发生降解反应。

参考文献：

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[M]. 北京：中国医药出版社，2015. 330-331.

[2] Seitz M, Syrén PO, Steiner L, et al. Synthesis of heterocyclic terpenoids by promiscuous squalene – hopene cyclases[J]. Chem Bio Chem, 2013, 14(4): 436-439. DOI: 10. 1002/cbic. 201300018.

[3] Yang YY, Lee GJ, Yoon DH, et al. ERK1-and TBK1-targeted anti-inflammatory activity of an ethanol extract of *Dryopteris crassirhizoma*[J]. J Ethnopharmacol, 2013, 145(2): 499-508. DOI: 10. 1016/j. jep. 2012. 11. 019.

[4] Kishore Ch, Reddy AS, Yadav JS, et al. A concise total synthesis of (+)-deoxocassine and (-)-deoxoprosophylline from d-xylose[J]. Tetrahedron Let, 2012, 53(1): 4551-4554.

[5] Ibraheim ZZ, Ahmed AS, Gouda YG, Phytochemical and biological studies of Adiantum capillus-veneris L[J]. Saudi Pharm J, 2011, 19(2): 65-74. DOI: 10. 1016/j. jsps. 2011. 01. 007.

[6] 曹广尚，王 信，杨培民. 阴离子交换树脂分离纯化绵马贯众总多酚的工艺研究[J]. 中草药，2014，45(9)：1265-1269.

[7] 刘计权，谢树莲，李洋洋，等. 绵马贯众不同萃取部位的抑菌活性[J]. 中国实验方剂学杂志，2016，22(3)：137-142.

[8] 马传江，曹广尚，杨培民，等. 绵马贯众的鉴定化学成分及药理作用研究进展[J]. 中国药房，2016，27(28)：4013-4015.

[9] 赛春梅，崔琳琳，杨梦，等. 响应曲面法优化超声辅助提取诸葛菜总黄酮工艺及抗氧化活性研究[J]. 济宁医学院学报，2018，41(1)：53-58. DOI：10. 3969 /j. issn. 1000-9760. 2018. 01. 014.

[10] 丁平刚，董雪琦，郭莹莹，等. 复合酶法提取玄参多糖的优化工艺及其抗氧化活性研究[J]. 济宁医学院学报，2016，39(6)：426-432. DOI：10. 3969 /j. issn. 1000-9760. 2016. 06. 012.

[11] 马天成，孙宇，刘雷，等. 玉米须黄酮类成分提取工艺及抗氧化活性物质基础研究[J]. 中国现代应用药学，2019，36(22)：2794-2799.

（收稿日期　2019-10-19）
（本文编辑：石俊强）