

说明书

发明名称: 舒筋草、伸筋草配方颗粒薄层鉴别方法

[0001] 本申请要求于2023年10月25日提交中国专利局、申请号为202311397059.4、发明名称为“舒筋草、伸筋草配方颗粒薄层鉴别方法”的中国专利申请的优先权，其全部内容通过引用结合在本申请中。

技术领域

[0002] 本发明涉及分析检测技术领域，尤其是涉及一种舒筋草、伸筋草配方颗粒薄层鉴别方法。

背景技术

[0003] 舒筋草为石松科植物藤石松*Lycopodium casuarinoides*(Spring)Holub的干燥地上部分。具有祛风除湿、舒筋活血的功效。用于风湿麻木，跌打损伤，筋骨疼痛，月经不调等。

[0004] 伸筋草为石松科植物石松*Lycopodium japonicum* Thunb的干燥全草。具有祛风除湿，舒筋活络。用于关节酸痛，屈、伸不利等。

[0005] 因临床上舒筋草主要用于风湿性疾病，而伸筋草主要用于肌肉、骨骼损伤等，两者不可混用。但由于现行标准中舒筋草配方颗粒的薄层鉴别方法尚不完善，无有效的手段将其与易混淆品伸筋草配方颗粒进行区分。

[0006] 故则待建立一种能够对舒筋草配方颗粒进行有效鉴别并与其易混淆品伸筋草配方颗粒相区分的薄层方法。

[0007] 发明内容

[0008] 有鉴于此，本发明要解决的技术问题在于提供舒筋草、伸筋草配方颗粒薄层鉴别方法。

[0009] 本文术语“包括”、“包含”和“具有”之间可互换使用，旨在表示方案的包含性，意味着所述方案可存在除所列出的元素之外的其他元素。同时应当理解，在本文中使用“包括”、“包含”和“具有”描述，也提供“由……组成”方案。

- [0010] 本申请中，术语“和/或”，描述关联对象的关联关系，表示可以存在三种关系，例如，A和/或B，可以表示：单独存在A，同时存在A和B，单独存在B的情况。其中A,B可以是单数或者复数。
- [0011] 本申请中，“至少一个”是指一个或者多个，“多个”是指两个或两个以上。“以下至少一项(个)”或其类似表达，是指的这些项中的任意组合，包括单项(个)或复数项(个)的任意组合。
- [0012] 应理解，在本申请的各种实施例中，下述各过程的序号的大小并不意味着执行顺序的先后，部分或全部步骤可以并行执行或先后执行，各过程的执行顺序应以其功能和内在逻辑确定，而不应对本申请实施例的实施过程构成任何限定。
- [0013] 本发明提供了一种舒筋草、伸筋草配方颗粒的薄层鉴别方法，包括：
- [0014] A)取待测样品，预处理后，得到供试品溶液；
- [0015] B)取舒筋草对照药材，预处理后，得到对照药材溶液；
- [0016] C)将供试品溶液和对照药材溶液进行薄层色谱检测，薄层板为硅胶G薄层板；展开剂为环己烷-乙酸乙酯；
- [0017] D)置紫外光灯下检视，在供试品色谱中，若在R_f值为0.31~0.464处有蓝色荧光斑点，则为舒筋草配方颗粒；若在R_f值为0.321~0.464处无蓝色荧光斑点，则为伸筋草配方颗粒。
- [0018] 本发明所述步骤A)所述预处理具体为：取待测样品加石油醚溶解后，加热回流提取，弃去石油醚液，加水煎煮，过滤后加甲醇超声处理，过滤后，残渣加甲醇溶解，得到供试品溶液。
- [0019] 具体的，所述待测样品、水和甲醇的质量体积比为：1g：100mL：40mL。
- [0020] 一些实施例中，所述加热回流提取的时间为2~3h；所述煎煮的时间为1.5~2h；所述超声处理的时间为30~40min；所述石油醚的沸点为60~90℃。
- [0021] 一些实施例中，所述加热回流提取的时间为3h；所述煎煮的时间为2h；所述超声处理的时间为30min；所述石油醚的沸点为60~90℃。
- [0022] 取舒筋草对照药材，预处理后，得到对照药材溶液。其中，所述预处理具体为：取舒筋草对照药材加石油醚溶解后，加热回流提取，弃去石油醚液，加水煎煮，过滤后加甲醇超声处理，过滤后，残渣加甲醇溶解，得到对照药材溶液。

- [0023] 具体的,所述对照药材、石油醚、水和甲醇的质量体积比为:1g: mL: 100mL: 40mL
- [0024] 一些实施例中,所述加热回流提取的时间为1~2h;所述煎煮的时间为1.5~2h;所述超声处理的时间为30~40min;所述石油醚的沸点为60~90℃。
- [0025] 一些实施例中,所述加热回流提取的时间为2h;所述煎煮的时间为2h;所述超声处理的时间为30min;所述石油醚的沸点为60~90℃。
- [0026] 将供试品溶液和对照药材溶液进行薄层色谱检测。
- [0027] 优选为:吸取供试品溶液,对照药材溶液,分别点于同一硅胶G薄层板上,以展开剂展开,取出,晾干,置紫外光灯下检视。
- [0028] 本发明所述紫外光波长为365nm。
- [0029] 本发明所述薄层板为硅胶G薄层板。可以选自天津思利达科技有限公司可剪裁型薄层层析板,默克,青岛海洋化工厂分厂预制硅胶G板。
- [0030] 结果表明,三种薄层板中距原点3.193~5.130cm处的蓝色荧光斑点比移值(R_f)分别为0.424、0.310、0.354,均能达到鉴别要求。用以鉴别舒筋草配方颗粒。
- [0031] 置紫外光灯下检视,若供试品色谱中,若在R_f值为0.31~0.464处有蓝色荧光斑点,则为舒筋草配方颗粒;若在R_f值为0.31~0.464处无蓝色荧光斑点,则为伸筋草配方颗粒。
- [0032] 其中所述R_f值为0.31~0.464;具体可以为0.421、0.437、0.424、0.310、0.354、0.417、0.428、0.481、0.460、0.468、0.459和0.409。
- [0033] 本发明所述供试品溶液点样量为1~5 μL;所述对照药材溶液点样量为1~3 μL。
- [0034] 本发明其中一部分优选实施方式中,所述环己烷-乙酸乙酯的质量比为5:4;其中所述石油醚的沸点为60~90℃。
- [0035] 本发明检视温度为4℃~35℃。本发明的方法对不同温度的适应性较好,且在比移值0.417、0.428、0.481处舒筋草配方颗粒呈蓝色荧光斑点,而伸筋草配方颗粒无斑点。

- [0036] 本发明所述检视湿度为32%rh~75%rh。本发明的方法对不同湿度的适应性较好，且在比移值0.584、0.613、0.599处舒筋草配方颗粒呈蓝色荧光斑点，而伸筋草配方颗粒无斑点。
- [0037] 本发明所述待测样品为舒筋草和/或伸筋草配方颗粒。
- [0038] 本发明提供了一种舒筋草、伸筋草配方颗粒薄层鉴别方法，包括：一种舒筋草、伸筋草配方颗粒的薄层鉴别方法，包括：A)取待测样品，预处理后，得到供试品溶液；B)取舒筋草对照药材，预处理后，得到对照药材溶液；C)将供试品溶液和对照药材溶液进行薄层色谱检测，薄层板为硅胶G薄层板；展开剂为环己烷-乙酸乙酯；D)置紫外光灯下检视，在供试品色谱中，若在R_f值为0.31~0.464处有蓝色荧光斑点，则为舒筋草配方颗粒；若在R_f值为0.31~0.464处无蓝色荧光斑点，则为伸筋草配方颗粒。本发明建立的舒筋草、伸筋草配方颗粒薄层鉴别色谱方法，通过观察薄层色谱图谱在指定比移值范围内是否存在荧光斑点，作为鉴别点，用以快速、有效鉴别舒筋草、伸筋草配方颗粒。

附图说明

- [0039] 图1为点样量考察；
- [0040] 图2为专属性考察；
- [0041] 图3为不同薄层板考察-天津思利达。
- [0042] 图4不同薄层板考察-默克；
- [0043] 图5为不同薄层板考察-青岛海洋；
- [0044] 图6为不同温度-4℃；
- [0045] 图7为不同温度-25℃；
- [0046] 图8为不同温度-35℃；
- [0047] 图9为不同湿度-32%；
- [0048] 图10为不同湿度-51%；
- [0049] 图11为不同湿度-75%；
- [0050] 图12为多批次验证结果；
- [0051] 图13本发明对比例1的结果图；
- [0052] 图14对比例2方法结果图；

[0053] 图15为对比例2方法结果图。

具体实施方式

[0054] 为了进一步说明本发明，以下结合实施例对本发明提供的一种舒筋草、伸筋草配方颗粒薄层鉴别方法进行详细描述。

[0055] 水浴锅、索氏提取器、加热板、薄层成像系统：CAMAG TLC Visualizer、硅胶G薄层板(青岛海洋化工厂，批号：20180527、天津思利达科技有限公司，批号：191016、默克，批号：HX87183353)

[0056] 石油醚(60~90℃)、甲醇、环己烷、乙酸乙酯均为分析纯，水为超纯水(实验室自制)。

[0057] 舒筋草对照药材(中国食品药品检定研究院，批号：380003-202104)，舒筋草配方颗粒(四川新绿色药业科技发展有限公司，批号：2302078、2302079、2302080)；伸筋草配方颗粒(四川新绿色药业科技发展有限公司，批号：2002001；2002002；2002003)。

[0058] 实施例1

[0059] 供试品溶液的制备

[0060] 取本品1g，研细，加石油醚(60-90℃)适量，置索氏提取器中，加热回流3小时，弃去石油醚液，药渣挥干，加水100ml煎煮2小时，滤过，滤液蒸干，残渣加甲醇40ml，超声处理30分钟，滤过，滤液蒸干，残渣加甲醇1ml使溶解，作为供试品溶液。照薄层色谱法(《中国药典》2020年版通则0502)试验，吸取供试品溶液1 μ l，对照药材溶液1 μ l，分别点于同一硅胶G薄层板上，以环己烷-乙酸乙酯(5：4)为展开剂，展开，取出，晾干，置紫外光灯(365nm)下检视。供试品色谱中，在与对照药材色谱相应的位置上，显相同颜色的荧光斑点。

[0061] 对照品及对照药材溶液的制备

[0062] 取药材粉末2g，加石油醚(60-90℃)适量，置索氏提取器中，加热回流2小时，弃去石油醚液，药渣挥干，加水100ml煎煮2小时，滤过，滤液蒸干，残渣加甲醇40ml，超声处理30分钟，滤过，滤液蒸干，残渣加甲醇1ml使溶解，作为对照药材溶液。

[0063] 实施例2方法学考察

[0064] 2.1点样量考察

[0065] 在以上拟定的实验条件下，分别取舒筋草对照药材溶液和舒筋草供试品溶液各1 μ l、3 μ l、5 μ l、10 μ l、15 μ l、20 μ l点在同一硅胶G薄层板上，薄层色谱荧光斑点显色清晰，确定对照药材溶液1–3 μ l、供试品溶液点样量为1–5 μ l。比移值(R_f)为0.421处呈相同颜色的斑点，可作为舒筋草配方颗粒鉴别点。

[0066] 2.2专属性考察

[0067] 按照以上供试品制备方法分别制备舒筋草对照药材溶液、舒筋草配方颗粒溶液、阴性溶液，进行薄层鉴别实验，按拟定色谱条件展开，结果见图2，由图可以看出，阴性样品对舒筋草配方颗粒供试品无干扰，该方法专属性较好。可以用于鉴别舒筋草配方颗粒。

[0068] 2.3耐用性的考察

[0069] 2.3.1不同薄层板的比较

[0070] 选取天津思利达科技有限公司可剪裁型薄层层析板，默克，青岛海洋化工厂分厂预制硅胶G板、分别按拟定的试验方法进行试验，见图3~5，结果表明，三种薄层板中距原点3.193~5.130cm处的蓝色荧光斑点比移值(R_f)分别为0.424、0.310、0.354，均能达到鉴别要求。用以鉴别舒筋草配方颗粒。

[0071] 结果如图3，图3为不同薄层板考察–天津思利达。其中:1为舒筋草对照药材溶液；2–4为舒筋草配方颗粒溶液。

[0072] 图4不同薄层板考察–默克；其中:1为舒筋草对照药材溶液；2–4为舒筋草配方颗粒溶液。

[0073] 图5为不同薄层板考察–青岛海洋；其中1为舒筋草对照药材溶液；2–4为舒筋草配方颗粒溶液。

[0074] 2.3.2不同温度的比较

[0075] 取点样后的薄层板，分别在低温4℃和常温25℃和高温35℃的温度环境下进行展开。由图6~8可看出，该方法对不同温度的适应性较好，蓝色斑点比移值(R_f)分别为0.417、0.428、0.481。用以鉴别舒筋草配方颗粒。

[0076] 图6为不同温度–4℃；其中，1为舒筋草对照药材溶液；2–4为舒筋草配方颗粒溶液。

- [0077] 图7为不同温度-25℃，其中，1为舒筋草对照药材溶液；2-4为舒筋草配方颗粒溶液。
- [0078] 图8为不同温度-35℃，其中，1为舒筋草对照药材溶液；2-4为舒筋草配方颗粒溶液。
- [0079] 2.3.3不同湿度的比较
- [0080] 取点样后的薄层板，分别在32%rh和51%rh和75%rh的湿度环境下进行展开，见图9~11。由图可看出，该方法对不同温度的适应性较好，蓝色斑点比移值(R_f)分别为0.584、0.613、0.599。用以鉴别舒筋草配方颗粒。
- [0081] 图9为不同湿度-32%；其中1为舒筋草对照药材溶液；2-4为舒筋草配方颗粒溶液。
- [0082] 图10为不同湿度-51%；其中1为舒筋草对照药材溶液；2-4为舒筋草配方颗粒溶液。
- [0083] 图11为不同湿度-75%；其中1为舒筋草对照药材溶液；2-4为舒筋草配方颗粒溶液。
- [0084] 2.3.4验证
- [0085] 3批舒筋草配方颗粒斑点进行薄层鉴别验证，距原点5.03cm处的蓝色荧光斑点的比移值(R_f)为0.409，实验结果见图12。
- [0086] 图12为多批次验证结果；其中，1为舒筋草对照药材溶液；2-4为舒筋草配方颗粒溶液。
- [0087] 2.4舒筋草配方颗粒、伸筋草配方颗粒区分
- [0088] 按照以上供试品制备方法分别制备舒筋草配方颗粒溶液、伸筋草配方颗粒溶液，进行薄层鉴别实验，舒筋草配方颗粒在距原点5.2cm处的蓝色荧光斑点比移值(R_f)为0.591，而伸筋草配方颗粒在此处没有斑点。结果见图13，其中，1，2为舒筋草配方颗粒；3，4为伸筋草配方颗粒；由图可以看出，该方法可以用于区分舒筋草配方颗粒和伸筋草配方颗粒。
- [0089] 2.5舒筋草配方颗粒、伸筋草配方颗粒鉴别点R_f确定
- [0090] 将薄层色谱方法学考察中各项比移值数据汇总，结果见表1。根据汇总结果，确定舒筋草配方颗粒鉴别斑点比移值(R_f)应在10%范围内，规定值为0.482。

[0091] 表1方法学考察比移值汇总

项目	鉴别点 1			
	比移值	平均值	RSD%	范围
点样量	0.421	0.422	11.520	0.310~0.464
专属性	0.437			
思利达薄层板	0.424			
默克薄层板	0.310			
海洋薄层板	0.354			
不同温度-4	0.417			
不同温度-22	0.428			
不同温度-35	0.481			
不同湿度-32%	0.460			
不同湿度-51%	0.468			
不同湿度-75%	0.459			
不同批次验证	0.409			

[0092] 对比例1

[0093] 取本品2g，研细，加水40mL煎煮3小时，滤过，滤液蒸干，加甲醇20mL，超声30分钟，滤过，滤液蒸干，残渣加甲醇2ml使溶解，作为供试品溶液。另取舒筋草对照药材1g，及去舒筋草的阴性对照品2g同法制成对照药材溶液和阴性对照品溶液。吸取上述溶液各5μL，分别点于同一硅胶G薄层板上用环己烷-乙酸乙酯(8：5)为展开剂展开，取出，晾干。置紫外灯(365nm)下检视。供试品色谱中在与对照药材色谱相应位置上未显红色斑点，阴性对照无干扰，结果见图14。图14本发明对比例1的结果图。其中：1-2为舒筋草对照药材溶液；3-4为舒筋草配方颗

粒溶液；5为阴性对照溶液。结果表明，采用上述薄层鉴别方法，舒筋草对照药材斑点与配方颗粒成品不一致，不能将二者进行鉴别。

[0094] 对比例2

[0095] 取本品2g，研细，加氨水5mL搅拌均匀，再加氯仿20ml，加热回流2小时，滤过，滤液置分液漏斗中，加2%硫酸溶液20mL振摇，取酸水层加氢氧化钠溶液调PH8~9，置分液漏斗中，加氯仿提取，每次10ml共两次，浓缩氯仿提取液至2ml，作为供试品溶液。另取舒筋草对照药材2g，及去舒筋草的阴性对照品2g同法制成对照药材溶液和阴性对照品溶液。吸取上述溶液各10 μ L，分别点于同一硅胶G薄层板上用氯仿-甲醇-丙酮-氨水(40:5:5:2)为展开剂展开,取出，晾干。用碘-碘化钾和碘化铍钾等量混合显色。置日光下检视。供试品色谱中在与对照药材色谱相应位置上显黄棕色斑点，阴性对照无干扰，结果见图15。

[0096] 图15为对比例2方法结果图。1阴性对照品溶液；2舒筋草对照药材溶液；3~5为舒筋草配方颗粒溶液。

[0097] 结果表明，采用上述薄层鉴别方法，舒筋草配方颗粒显色斑点过少且不够美观，故不能将二者进行区分。

[0098] 以上所述仅是本发明的优选实施方式，应当指出，对于本技术领域的普通技术人员来说，在不脱离本发明原理的前提下，还可以做出若干改进和润饰，这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。

权利要求书

- [权利要求 1] 一种舒筋草、伸筋草配方颗粒的薄层鉴别方法，包括：
- A)取待测样品，预处理后，得到供试品溶液；
- B)取舒筋草对照药材，预处理后，得到对照药材溶液；
- C)将供试品溶液和对照药材溶液进行薄层色谱检测，薄层板为硅胶G薄层板；展开剂为环己烷-乙酸乙酯；
- D)置紫外光灯下检视，在供试品色谱中，若在R_f值为0.31～0.464处有蓝色荧光斑点，则为舒筋草配方颗粒；若在R_f值为0.31～0.464处无蓝色荧光斑点，则为伸筋草配方颗粒。
- [权利要求 2] 根据权利要求1所述的方法，其特征在于，所述步骤A)所述预处理具体为：取待测样品加石油醚溶解后，加热回流提取，弃去石油醚液，加水煎煮，过滤后加甲醇超声处理，过滤后，残渣加甲醇溶解，得到供试品溶液。
- [权利要求 3] 根据权利要求2所述的方法，其特征在于，所述待测样品、水和甲醇的质量体积比为：1g：100mL：40mL；
- 所述加热回流提取的时间为2～3h；所述煎煮的时间为1.5～2h；所述超声处理的时间为30～40min；所述石油醚的沸点为60～90℃。
- [权利要求 4] 根据权利要求1所述的方法，其特征在于，步骤B)所述预处理具体为：取舒筋草对照药材加石油醚溶解后，加热回流提取，弃去石油醚液，加水煎煮，过滤后加甲醇超声处理，过滤后，残渣加甲醇溶解，得到供试品溶液；
- 所述加热回流提取的时间为1～2h；所述煎煮的时间为1.5～2h；所述超声处理的时间为30～40min；所述石油醚的沸点为60～90℃。
- [权利要求 5] 根据权利要求1所述的方法，其特征在于，所述供试品溶液点样量为1～5 μL；所述对照药材溶液点样量为1～3 μL。
- [权利要求 6] 根据权利要求1所述的方法，其特征在于，步骤D)所述环己烷-乙酸乙酯的质量比为5:4。

- [权利要求 7] 根据权利要求1所述的方法，其特征在于，步骤E)所述紫外光波长为365nm。
- [权利要求 8] 根据权利要求1所述的方法，其特征在于，步骤E)检视温度为4℃ ~ 35℃。
- [权利要求 9] 根据权利要求8所述的方法，其特征在于，步骤E)所述检视湿度为32%rh ~ 75%rh。
- [权利要求 10] 根据权利要求1所述的方法，其特征在于，步骤A)所述待测样品为舒筋草和/或伸筋草配方颗粒。