

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2020.23.012

小柴胡颗粒薄层鉴别方法研究*

冯文明,沙樟炜,周丹丹[△]

(鉴甄检测技术 < 上海 > 有限公司,上海 200131)

摘要:目的 优化 2015 年版《中国药典(一部)》中小柴胡颗粒的薄层色谱鉴别方法。方法 建立“一板多药”的鉴别方法,对小柴胡颗粒中的柴胡、黄芩和甘草同时进行定性鉴别。结果 柴胡皂苷 b₂、柴胡皂苷 H、甘草苷对照品和柴胡、黄芩对照药材薄层鉴别斑点清晰,分离度好,且阴性制剂无干扰。结论 该方法专属性强,耐用性好,可用于小柴胡颗粒的质量控制。

关键词:小柴胡颗粒;薄层色谱鉴别;柴胡;黄芩;甘草

中图分类号:R932;R284.1;R286.0

文献标识码:A

文章编号:1006-4931(2020)23-0046-04

Identification Method of Xiaochaihu Granules by TLC

FENG Wenming, SHA Yiwei, ZHOU Dandan

(GenChim Testing <Shanghai> Co., Ltd., Shanghai, China 200131)

Abstract: Objective To optimize the thin layer chromatographic(TLC) identification method for Xiaochaihu Granules based on the current national standard of *Chinese Pharmacopoeia*(2015 edition, Volume I). **Methods** The method of "identification of multiple drugs with one TLC plate" was established for the simultaneous identification of *Radix Bupleuri*, *Radix Scutellariae* and *Radix Glycyrrhizae* in Xiaochaihu Granules. **Results** The TLC spots of the reference substances(saikosaponin b₂, saikosaponin H, liquiritin) and the reference medicinal materials (*Radix Bupleuri*, *Radix Scutellariae*) were clear with good resolution and the negative samples had no interferences. **Conclusion** The method is specific and robust, which can be used for the quality control of Xiaochaihu Granules.

Key words: Xiaochaihu Granules; TLC identification; *Radix Bupleuri*; *Radix Scutellariae*; *Radix Glycyrrhizae*

小柴胡颗粒源自东汉张仲景《伤寒杂病论》记载的经典名方小柴胡汤,为和解剂之祖方,由党参(原方为人参)、柴胡、黄芩、姜半夏、生姜、大枣、甘草 7 味中药组方,具有解表散热、疏肝和胃之功效,主要用于外感病、邪犯少阳证等。目前,小柴胡颗粒执行 2015 年版《中国药典(一部)》质量标准^[1],涉及柴胡、黄芩和甘草 3 个独立的薄层色谱鉴别,操作复杂、耗时、低效、高成本。本研究在现有标准和现有文献[2-3]基础上,建立了“一板多药”的鉴别方法,可同时对小柴胡颗粒中柴胡(君药)、黄芩(臣药)和甘草(佐使药)3 味药材进行薄层色谱鉴别,操作简单快速,专属性强,耐用性好,进一步完善了小柴胡颗粒的质量标准。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

ATS4 型薄层色谱自动点样仪,Visualizer 2 型薄层色谱成像系统,均购自瑞士卡玛公司;TH-II 型薄层加热器(上海科哲生化科技有限公司);KBF(E5.3)型恒温恒湿箱(德国宾得公司);XSE105DU 型电子天平(梅特勒-托利多 < 上海 > 有限公司,精度为十万分之一);QUINTIX2102-1CN 型电子天平(赛多利斯科学仪器 < 北京 > 有限公司,精度为百分之一);P120H 型超声波清洗仪(德国 Elma 公司,功率为 1130 W,频率为 50/60 kHz);

TW20 型恒温水浴锅(德国优莱博公司);ST-40R 型高速冷冻离心机、ST-40 型高速离心机(赛默飞世尔科技公司);A10 型超纯水系统(美国密理博公司)。

1.2 试剂

柴胡对照药材(批号为 120992-201509),黄芩对照药材(批号为 120955-201810),甘草苷对照品(批号为 111610-201908),均购自中国食品药品检定研究院;柴胡皂苷 b₂ 对照品(批号为 Z04S9L69482,上海源叶生物科技有限公司);柴胡皂苷 H 对照品(批号为 DST191009-014,成都德思特生物技术有限公司);小柴胡颗粒(规格为每袋 10 g,批号分别为 k90106, k90108, k90116, k90117, k90125, k90141, k90143, k90148, k90150, k90155, k90156, k90157, k90158, k90159, k90162);柴胡药材、黄芩药材、甘草药材、柴胡阴性制剂、黄芩阴性制剂、甘草阴性制剂,均购自广州白云山光华制药股份有限公司,由本公司孟千万讲师鉴定为正品。HSGF254 型薄层色谱硅胶预制板(烟台市化学工业研究所,银龙板,批号为 20190912);HPTLC Silica gel 60 F254(1.05642)型 Merck 板(德国 Merck 公司,批号为 HX87113742);HPTLC-Fertigplatten Nano-SIL-20 UV254(811023)型 MN 板(德国 MN 公司,批号为 309259);其余试剂均为分析纯,购自上海泰坦科技股份

*基金项目:国家重点研发计划子课题[2018YFC1707304]。

第一作者:冯文明,男,硕士研究生,研究方向为中药化学成分及质量标准,(电子信箱)tcm089@163.com。

[△]通信作者:周丹丹,女,博士研究生,研究方向为药物分析及质量控制,(电子信箱)zhoudandan@genchim.com。

有限公司。

2 方法与结果

2.1 方法

2.1.1 溶液制备

取样品 2 g, 加 15 mL 水, 超声处理(功率为 330 W, 频率为 37 kHz)使溶解, 用水饱和正丁醇萃取 2 次, 每次 15 mL, 合并正丁醇液, 用 1% 氢氧化钠溶液 10 mL 洗涤, 取正丁醇液, 蒸干, 残渣加甲醇 1 mL, 溶解, 作为供试品溶液。

取柴胡对照药材 0.5 g, 加入 30 mL 水, 加热回流 1.5 h, 放冷, 滤过, 滤液自“用水饱和正丁醇萃取 2 次”起同法制备柴胡对照药材溶液。

取黄芩对照药材 0.1 g, 加 4 mL 甲醇, 超声 20 min, 离心, 取上清液, 作为黄芩对照药材溶液。

取甘草苷对照品、柴胡皂苷 b_2 对照品、柴胡皂苷 H 对照品适量, 分别加入甲醇制成每 1 mL 含 0.1 mg 甘草苷、0.5 mg 柴胡皂苷 b_2 、0.2 mg 柴胡皂苷 H 的溶液, 作为对照品溶液。

2.1.2 “一板多药”定性鉴别

照薄层色谱法(通则 0502)试验, 吸取上述对照品溶液和供试品溶液 5~10 μ L, 对照药材溶液 1~2 μ L, 分别点于同一高效硅胶 G 薄层板上, 使其成条带状(8 mm), 以乙酸乙酯-丙酮-无水甲酸-水(7:1:1:1, $V/V/V/V$)为展开剂, 展开缸滤纸饱和 20 min, 展距 6 cm, 取出, 晾干, 喷以硫酸乙醇溶液, 在 105 $^{\circ}$ C 加热 3~4 min, 置紫外灯(365 nm)下检视。供试品溶液色谱中, 在与柴胡皂苷 b_2 、柴胡皂苷 H 对照品、柴胡对照药材溶液色谱相应位置上显相同棕红色荧光斑点; 在与黄芩对照药材溶液色谱相应位置上显相同的蓝色荧光斑点; 在与甘草苷对照品溶液色谱相应位置上显相同的黄色荧光斑点。

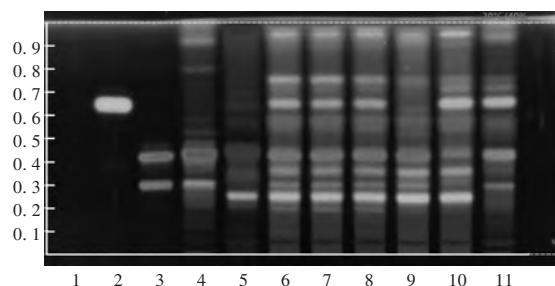
2.2 结果

2.2.1 专属性考察^[4]

分别取阴性制剂 2 g, 按供试品溶液制备方法制备阴性制剂溶液并点样, 色谱图见图 1。结果在与柴胡皂苷 b_2 、柴胡皂苷 H 对照品、柴胡对照药材溶液色谱相应位置上, 供试品溶液(批号为 k90108, k90116, k90125)显相同的棕色荧光斑点; 在与黄芩对照药材溶液色谱相应位置上显相同的蓝色荧光斑点; 在与甘草苷对照品溶液色谱相应位置上显相同的黄色荧光斑点, 且阴性制剂均无干扰, 表明此方法专属性强。

2.2.2 耐用性考察^[4]

考察不同厂家的高效硅胶板(Merck 板, MN 板和银龙板)、不同展开温度(10, 20, 30 $^{\circ}$ C)和不同展开相对湿度(30%, 50%, 70%)对其薄层色谱行为的影响。结果见图 2。可见, 上述因素对小柴胡颗粒的薄层色谱行为影响较小, 本方法斑点清晰, 耐用性良好。



1. 空白溶剂 2. 甘草苷对照品溶液($R_f=0.68$) 3. 柴胡皂苷 b_2 对照品溶液($R_f=0.42$)、柴胡皂苷 H 对照品溶液($R_f=0.30$)
4. 柴胡对照药材溶液 5. 黄芩对照药材溶液 6-8. 供试品溶液(批号分别为 k90108, k90116, k90125) 9. 甘草阴性制剂溶液
10. 柴胡阴性制剂溶液 11. 黄芩阴性制剂溶液

图 1 专属性试验薄层色谱图

2.3 样品检测

另取 12 批样品验证方法的适用性。结果见图 3, 供试品溶液色谱中, 在与柴胡皂苷 b_2 对照品、柴胡皂苷 H 对照品溶液色谱相应位置上显相同的棕红色荧光斑点; 在与黄芩对照药材溶液色谱相应位置上显相同的蓝色荧光斑点; 在与甘草苷对照品溶液色谱相应位置上显相同的黄色荧光斑点。对照品甘草苷 $R_f=0.66$, 柴胡皂苷 b_2 $R_f=0.42$, 柴胡皂苷 H $R_f=0.31$, 黄芩鉴别点 $R_f=0.26$ 。

3 讨论

薄层色谱法操作简单灵活, 专属性强, 可快速有效地鉴定真伪, 在中药分析领域应用广泛^[5-6], 美国药典(USP)和欧洲药典(EP)均推荐用于天然药物的鉴别。

2015 年版《中国药典(一部)》小柴胡颗粒标准中, 需要进行 3 次薄层色谱鉴别。柴胡鉴别的供试品溶液需通过聚酰胺柱进行制备; 甘草对照药材需用水煎煮提取; 黄芩鉴别需调节 pH、萃取等。操作烦琐、耗时, 检测效率低, 成本高。因此, 有必要提升和优化小柴胡颗粒的鉴别方法。

柴胡为方中君药, 其中皂苷类成分以柴胡皂苷 a 和柴胡皂苷 d 为主, 柴胡经煎煮后, 两者会转换成柴胡皂苷 b_1 和 b_2 ^[7-8]。第 17 版《日本药典》(日本药局方)中小柴胡汤的质量标准^[9]分别以柴胡皂苷 b_2 和甘草苷对照品为对照对柴胡和甘草进行鉴别。采用模拟制剂生产工艺的方法, 对柴胡药材和甘草药材加热回流提取后, 按供试品溶液制备方法制备。其中, 柴胡药材有 2 个特征斑点($R_f=0.42, 0.30$)传递到制剂中, 分别为柴胡皂苷 b_2 和柴胡皂苷 H。前期研究发现, 甘草药材中有 1 个特征斑点(甘草苷, $R_f=0.64$)传递到制剂中。考虑到柴胡皂苷 H 对照品不易购买, 且价格昂贵, 可选择以柴胡皂苷 b_2 和柴胡对照药材为参照, 对小柴胡颗粒中的柴胡进行鉴别。

2015 年版《中国药典(一部)》标准中仅使用黄芩苷

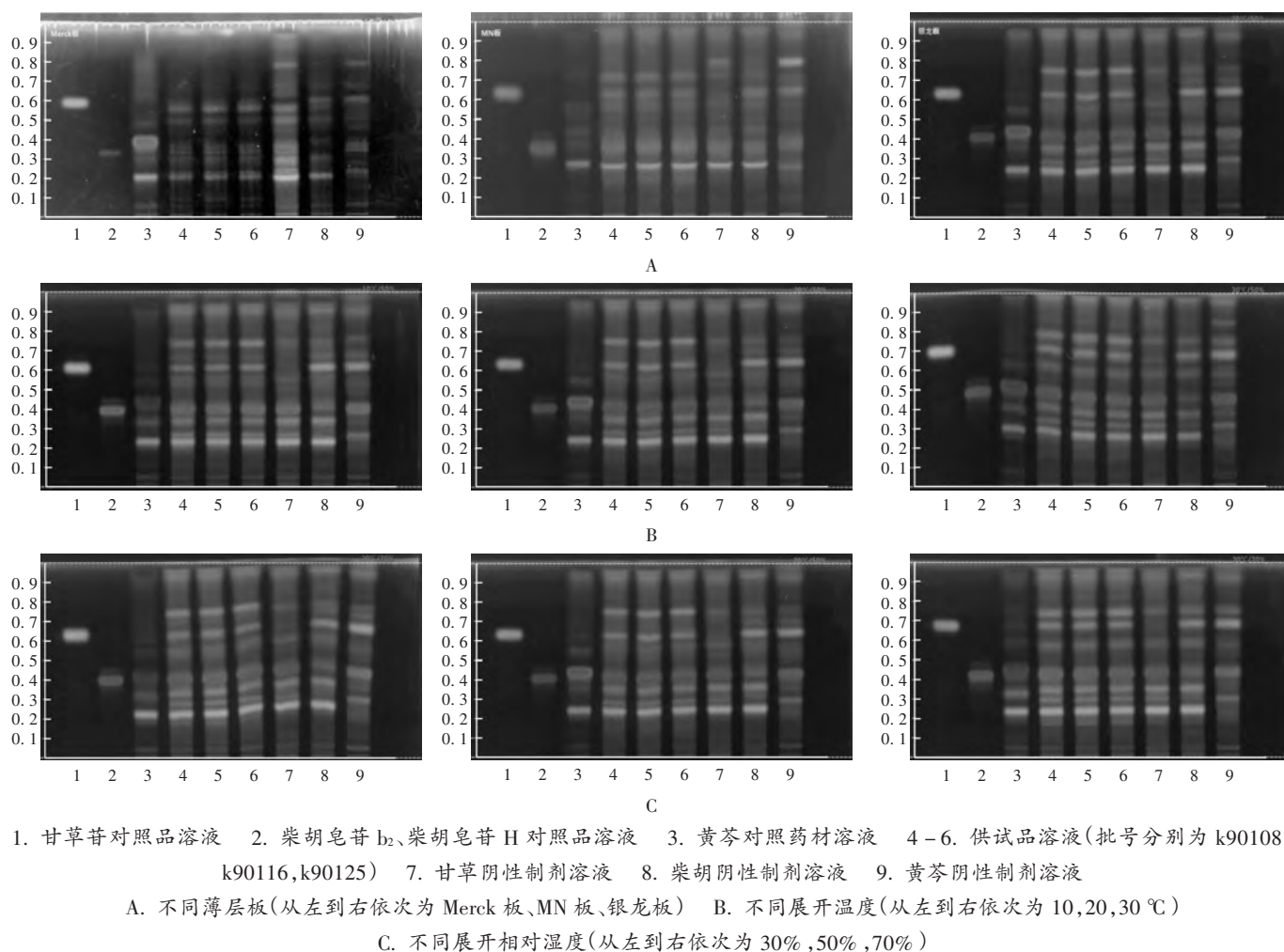


图 2 耐用性试验薄层色谱图

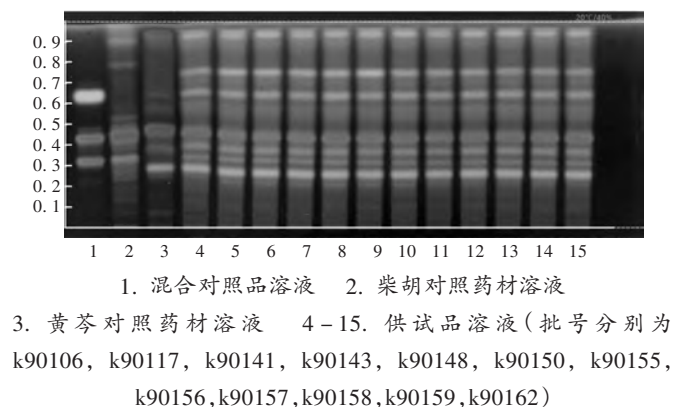


图 3 样品检测薄层色谱图

鉴别黄芩。本方法中检测出了一个具有黄芩专属性的特征斑点 ($R_f = 0.24$), 可丰富黄芪药材鉴定信息。经试验发现, 经甲醇超声处理后就能提取出黄芩药材的特征斑点, 最终确定黄芩对照药材以超声处理方式制备。

党参炔苷为党参的主要有效成分, 曾考察 2015 年版《中国药典(一部)》中小柴胡胶囊和小柴胡泡腾片^[1]项下党参的 TLC 鉴别方法。研究发现, 供试品溶液与阴性制剂的薄层色谱行为完全一致, 故药典方法无法实现

转移。同时, 采用不同的展开体系仍未检出党参炔苷。液相色谱法分析结果显示, 小柴胡颗粒中党参炔苷的含量非常低, 无法作为 TLC 的特征成分进行鉴别。6-姜辣素为生姜的主要有效成分, 但在制剂中未检出 6-姜辣素, 且液相色谱结果佐证此结果。推测可能是, 在浓缩过程中 6-姜辣素等芳香性成分受到了损失。半夏主要成分是淀粉, 少量氨基酸和其他小极性成分, 在制剂中未检出氨基酸色谱条带。大枣主要成分是多糖及三萜类成分(如齐墩果酸和白桦脂酸等), 尝试以齐墩果酸和白桦脂酸为对照, 均未检出相应条带。因此, 下阶段的工作重点是建立党参、生姜、半夏、大枣的薄层色谱鉴别方法。

对“一板多药”鉴别方法展开剂的考察, 确定乙酸乙酯-丙酮-无水甲酸-水(7:1:1:1, V/V/V/V)、乙酸乙酯-丙酮-无水甲酸-水(5:2:1:1, V/V/V/V)、乙酸乙酯-正丁醇-无水甲酸-水(5:2:1:1, V/V/V/V)3 个展开系统。通过考察不同展开剂对供试品溶液的色谱条带成点性、分离度及 R_f 值的影响, 确定最佳展开系统。结果表明, 3 个展开系统均能在与柴胡皂苷 b₂ 对照品溶液、柴胡皂苷 H 对照品溶液色谱相应位