

说明书

一种白果仁配方颗粒、炒白果仁配方颗粒的薄层色谱鉴别方法

本申请要求于 2023 年 10 月 07 日提交中国专利局、申请号为 202311293808.9、发明名称为“一种白果仁配方颗粒、炒白果仁配方颗粒的薄层色谱鉴别方法”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

本发明属于药物检测技术领域，具体涉及一种白果仁配方颗粒、炒白果仁配方颗粒的薄层色谱鉴别方法。

背景技术

白果为银杏科植物银杏 *Ginkgo biloba* L. 的干燥成熟种子，具有敛肺定喘，止带缩尿的功效。但白果因其生品有小毒，临床使用时需炮制后入药，有研究表明经清炒后的白果可以大大降低其毒性，增加用药的准确性和安全性，且其炮制品能增强收敛作用，主要有温肺益气、定喘嗽、缩小便、止白浊的功效，由此可见二者的化学成分可能发生了变化。

李转梅等人将白果不同炮制品中的白果酸和总银杏酸进行比较，发现经去皮、炒制或蒸煮后均可明显降低白果中白果酸和总银杏酸的量，从而降低毒性，但就炒、蒸、煮三种方法而言，炒法温度更高，炒制时间更短，去毒效果好。李娟等人等通过HPLC-UV法对比不同产地的白果经清炒后银杏内酯A、银杏内酯C的含量，结果表明，不同产地白果清炒后银杏内酯A、银杏内酯C的含量差别不大，与炮制后损失的含量相当。由于白果清炒后银杏内酯A、银杏内酯C的含量虽有一定的降低，但与生品相比没有质的差异。因此，需要制定出专属性更强、重复性更强、有效可控的方法，为炒白果配方颗粒的定性鉴别提供有效的手段。

发明内容

有鉴于此，本发明的目的在于提供一种白果仁配方颗粒、炒白果仁配方颗粒的薄层色谱鉴别方法。该方法通过观察薄层色谱图谱在某比移值范围内是否存在荧光斑点，作为鉴别依据，可以有效、快速区分白果仁配方颗粒、炒白果仁配方颗粒。

5 为达到此目的，本发明采用以下技术方案：

本发明提供一种白果仁配方颗粒、炒白果仁配方颗粒的薄层色谱鉴别方法，包括以下步骤：

将供试品溶液点涂于硅胶薄层板上，按照薄层色谱条件进行展开，展开结束后加入显色剂，加热后，检视。

10 优选地，所述薄层色谱条件中的展开剂为三氯甲烷-环己烷-丙酮-冰乙酸，所述三氯甲烷、环己烷、丙酮、冰乙酸的体积比为(8~12):(3~6):(3~6):(1.5~2.5)。

更优选地，所述三氯甲烷、环己烷、丙酮、冰乙酸的体积比为(10~12):(5~6):(5~6):2。

优选地，所述供试品溶液的点样量为15~25 μL 。

15 优选地，所述展开的环境温度为8~25 $^{\circ}\text{C}$ ，环境湿度为32~75 RH%。

优选地，检视的薄层色谱中，炒白果仁配方颗粒在比移值 R_{f1} 为0.648 $\pm$ 0.0648、比移值 R_{f2} 为0.741 $\pm$ 0.0741范围内有荧光斑点，白果仁配方颗粒无荧光斑点。

优选地，所述检视在紫外线下进行。

20 优选地，所述紫外线的波长为365 nm。

优选地，所述供试品溶液按照下述方法制备：

取供试品与水混合后，加热，过滤，将滤液采用柱层析处理，经水洗脱除去杂质后，用乙醇洗脱，收集洗脱液，除去乙醇后，加入乙酸乙酯提取，将乙酸乙酯液蒸干，残渣加甲醇，得到供试品溶液。

25 优选地，所述乙醇为50 vol%的乙醇。

优选地，所述薄层色谱鉴别方法还包括将对照品溶液和阴性溶液点涂于硅胶薄层板上的步骤。

优选地，所述对照品溶液中的对照品包括银杏内酯B和银杏内酯C。

优选地，所述对照品溶液的点样量为1~5 μL 。

30 优选地，所述阴性溶液的点样量为1~3 μL 。

与现有技术相比，本发明的有益效果为：

本发明提供了一种白果仁配方颗粒、炒白果仁配方颗粒的薄层色谱鉴别方法，该方法将供试品溶液点涂于硅胶薄层板上，按照薄层色谱条件进行展开，所使用的展开剂是体积比为(8~12):(3~6):(3~6):(1.5~2.5)的三氯甲烷-环己烷-丙酮-冰乙酸，展开结束后加入显色剂，加热后，进行检视即可。结果发现，得到的薄层色谱中炒白果仁配方颗粒在比移值 R_{f1} 为 0.648 ± 0.0648 、比移值 R_{f2} 为 0.741 ± 0.0741 范围内有荧光斑点，而白果仁配方颗粒无荧光斑点。因此，可以在上述 R_{f1} 范围内多出一个荧光斑点，作为炒白果仁配方颗粒鉴别点1，在 R_{f2} 的范围内多出一个荧光斑点，作为炒白果仁配方颗粒鉴别点2。经验证，本发明提供的上述薄层色谱鉴别方法，通过薄层色谱中的鉴别点1和2，能够快速、有效的鉴别出已失去饮片形态的炒白果仁配方颗粒，操作简便、精密度和灵敏度高、稳定性好，具有良好的应用前景。

附图说明

图1为不同点样量下对照品溶液、白果配方颗粒溶液、炒白果仁配方颗粒溶液的薄层色谱图；

图1中的1~3对应对照品溶液的点样量为1 μ L、2 μ L、5 μ L，4~6对白果仁配方颗粒溶液的点样量为15 μ L、20 μ L、25 μ L，7~9对应炒白果仁配方颗粒溶液的点样量为15 μ L、20 μ L、25 μ L；

图2为阴性溶液、对照品溶液、白果配方颗粒溶液、炒白果仁配方颗粒溶液的薄层色谱图；

图2中的1对应阴性溶液，2对应对照品溶液；3对应白果仁配方颗粒溶液；4对应炒白果仁配方颗粒溶液；

图3为采用天津思利达科技有限公司的硅胶G板时对照品溶液、白果配方颗粒溶液、炒白果仁配方颗粒溶液的薄层色谱图；

图3中的1~3分别对应对照品溶液、白果配方颗粒溶液、炒白果仁配方颗粒溶液；

图4为采用默克硅胶G板时对照品溶液、白果配方颗粒溶液、炒白果仁配方颗粒溶液的薄层色谱图；

图4中的1~3分别对应对照品溶液、白果配方颗粒溶液、炒白果仁配方颗粒溶液；

图5为采用青岛海洋硅胶试剂厂的硅胶G板时对照品溶液、白果配方颗粒溶液、炒白果仁配方颗粒溶液的薄层色谱图；

5 图5中的1~3分别对应对照品溶液、白果配方颗粒溶液、炒白果仁配方颗粒溶液；

图6为低温8℃下展开得到的对照品溶液、白果配方颗粒溶液、炒白果仁配方颗粒溶液的薄层色谱图；

10 图6中的1~3分别对应对照品溶液、白果配方颗粒溶液、炒白果仁配方颗粒溶液；

图7为常温25℃下展开得到的对照品溶液、白果配方颗粒溶液、炒白果仁配方颗粒溶液的薄层色谱图；

图7中的1~3分别对应对照品溶液、白果配方颗粒溶液、炒白果仁配方颗粒溶液；

15 图8为在32 RH%的湿度环境下展开得到的对照品溶液、白果配方颗粒溶液、炒白果仁配方颗粒溶液的薄层色谱图；

图8中的1~3分别对应对照品溶液、白果配方颗粒溶液、炒白果仁配方颗粒溶液；

20 图9为在75 RH%的湿度环境下展开得到的对照品溶液、白果配方颗粒溶液、炒白果仁配方颗粒溶液的薄层色谱图；

图9中的1~3分别对应对照品溶液、白果配方颗粒溶液、炒白果仁配方颗粒溶液；

图10为对照品溶液、以及对多批次白果配方颗粒溶液、多批次炒白果仁配方颗粒溶液进行验证的薄层色谱图；

25 图10中的1对应对照品溶液，2~4分别对应白果配方颗粒批号为2209001、2209002、2209003的溶液，5~7分别对应炒白果仁配方颗粒批号为2304047、2304048、2304049的溶液；

图11为采用三氯甲烷-环己烷-丙酮-冰乙酸（体积比8:3:3:1.5）为展开剂得到的对照品溶液、白果配方颗粒溶液、炒白果仁配方颗粒溶液的薄层色谱图；

30 图12为采用三氯甲烷-环己烷-丙酮-冰乙酸（体积比12:6:6:2.5）为展开剂得

到的对照品溶液、白果配方颗粒溶液、炒白果仁配方颗粒溶液的薄层色谱图；

图13为采用对比例1的薄层方法得到的对照品溶液、白果配方颗粒溶液、炒白果仁配方颗粒溶液的薄层色谱图；

图13中的1对应对照品溶液，2~3对应白果仁配方颗粒溶液的点样量为10
5 μL 、15 μL ，4~5对应炒白果仁配方颗粒溶液的点样量为10 μL 、15 μL ；

图14为采用三氯甲烷-环己烷-丙酮-冰乙酸（体积比10:10:5:2）为展开剂得到的对照品溶液、白果配方颗粒溶液、炒白果仁配方颗粒溶液的薄层色谱图。

图14中的1~2分别对应白果配方颗粒溶液、炒白果仁配方颗粒溶液；

图15为采用三氯甲烷-环己烷-丙酮-冰乙酸（体积比5:7:3:1）为展开剂得到
10 的对照品溶液、白果配方颗粒溶液、炒白果仁配方颗粒溶液的薄层色谱图；

图15中的1对应对照品溶液，2~3对应白果仁配方颗粒溶液，4~5对应炒白果仁配方颗粒溶液。

具体实施方式

15 下面将结合本发明实施例，对本发明的技术方案进行清楚、完整地描述，显然，所描述的实施例仅仅是本发明一部分实施例，而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例，本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例，都属于本发明保护的范围。

针对现有技术中缺乏有效的技术手段以定性鉴别炒白果配方颗粒的问题，
20 本发明提供了一种白果仁配方颗粒、炒白果仁配方颗粒的薄层色谱鉴别方法，包括以下步骤：

将供试品溶液点涂于硅胶薄层板上，按照薄层色谱条件进行展开，展开结束后加入显色剂，加热后，检视。

在本发明中，所述供试品溶液指的是白果仁配方颗粒溶液或炒白果仁配方
25 颗粒溶液，优选可以按照下述方法制备得到：

取供试品（即，白果仁配方颗粒或炒白果仁配方颗粒）与水混合后，加热，过滤，将滤液采用柱层析处理，经水洗脱除去杂质后，用乙醇洗脱，收集洗脱液，除去乙醇后，加入乙酸乙酯提取，将乙酸乙酯液蒸干，残渣加甲醇，得到供试品溶液。

按照本发明的上述方法, 首先将供试品的水溶液加热, 使得供试品溶解后, 过滤除去不溶物, 将得到的含供试品的滤液经柱层析提纯, 然后再将提纯后的供试品进一步用乙酸乙酯提取并浓缩, 以提高供试品的浓度, 最后将得到的固体用甲醇溶解, 得到相应的供试品溶液。

- 5 在本发明中, 所述供试品优选按照 1 g:(15~25) mL, 更优选按照 1 g:20 mL 的比例, 将供试品与水混合, 加热后, 使得供试品溶解后, 过滤除去不溶物, 将得到的含供试品的滤液经柱层析提纯。所述柱层析优选采用湿法装柱, 采用的柱子为聚酰胺柱, 所述聚酰胺柱的内径优选为 0.8~1.2 cm, 更优选为 1 cm; 装填的聚酰胺的目数优选为 30~60 目, 更优选为 40~50 目, 聚酰胺的装填量与供试品的质量比优选为 1:(0.8~1.5), 更优选为 1:1。所述柱层析的过程中, 10 优选采用水洗脱以除去杂质, 然后再用乙醇, 优选为 50 vol% 的乙醇洗脱, 收集洗脱液后, 优选水浴上蒸, 以除去乙醇。然后, 再将提纯后的供试品进一步用乙酸乙酯提取并浓缩, 所述提取的次数为 2 次或以上, 以提高供试品的浓度, 最后将乙酸乙酯液合并, 蒸干后, 将得到的固体用甲醇溶解, 所述供试品与甲 15 醇的比例优选为 1 g:(0.8~3) mL, 更优选为 1 g:1 mL, 即可得到相应的供试品溶液。

在本发明的一个具体实施方案中, 所述供试品溶液按照下述方法制备:

- 取供试品 (即, 白果仁配方颗粒或炒白果仁配方颗粒) 1 g, 加水 20 mL, 加热使溶解, 过滤, 滤液浓缩至 5 mL, 加入已处理好的聚酰胺柱 (30~60 目, 20 1 g, 内径为 1 cm, 用水湿法装柱) 上, 用水 50 mL 洗脱, 弃去水液用 50 vol% 乙醇 40 mL 洗脱, 收集洗脱液, 置水浴上蒸去乙醇, 水液用乙酸乙酯振摇提取 2 次, 每次 20 mL, 合并乙酸乙酯液, 蒸干, 残渣加甲醇 1 mL 使溶解, 作为供试品溶液。

- 按照本发明, 在得到供试品溶液后, 将供试品溶液点涂于硅胶薄层板上, 25 按照薄层色谱条件进行展开, 展开结束后加入显色剂, 加热后, 检视。其中, 其中, 硅胶薄层板优选为硅胶 G 薄层板。本发明经耐用性研究, 发现采用不同厂家生产的硅胶薄层板均能达到相应效果, 表明该方法对于不同薄层板的适应性良好, 因此对硅胶薄层板的来源没有特别的限制。同时, 经点样量考察, 发现当供试品溶液的点样量为 15~25 μ L 时, 得到的薄层色谱中斑点显色清晰, 30 分离度好, 因此将供试品溶液的点样量优选为 15~25 μ L, 更优选为 20~25 μ L,

最优选为 25 μ L。

需要注意的是,并不是所有的展开剂都能使得白果仁配方颗粒或炒白果仁配方颗粒有展开效果,本发明经研究,将薄层色谱条件中的展开剂优选为三氯甲烷-环己烷-丙酮-冰乙酸,为了保证二者的分离度好,斑点显色好,本发明优选,所述三氯甲烷、环己烷、丙酮、冰乙酸的体积比为(8~12):(3~6):(3~6):(1.5~2.5),更优选为(10~12):(5~6):(5~6):2,最优选为 10:5:5:2。

本发明在不同温度 and 不同湿度的展开环境下,对上述供试品溶液进行薄层色谱分离,发现该方法对温度和湿度的适应性强,展开的环境温度可以在 8~25°C 范围内,具体可以是 8°C、10°C、15°C、20°C 或 25°C 等;环境湿度可以在 32~75 RH% 范围内,具体可以是 32 RH%、35 RH%、40 RH%、45 RH%、50 RH%、55 RH%、60 RH%、65 RH%、70 RH% 或 75 RH% 等。

所述展开结束后,为了能够在检视时出现荧光斑点,需要在硅胶薄层板上喷以显色剂,所述显色剂优选为醋酐溶液,在 140~160°C,优选 150°C,加热 20~40min,优选加热 30 min,置紫外光灯(365 nm)下检视。

检视完成后,观察得到的白果仁配方颗粒或炒白果仁配方颗粒的供试品的薄层色谱图可知,炒白果仁配方颗粒在比移值 R_{f1} 为 0.648 ± 0.0648 (即,大约在 0.58~0.71) 相较于白果仁配方颗粒多出一个荧光斑点,作为炒白果仁配方颗粒鉴别点 1;在比移值 R_{f2} 为 0.741 ± 0.0741 (即,大约在 0.67~0.82) 范围内相较于白果仁配方颗粒多出一个荧光斑点,作为炒白果仁配方颗粒鉴别点 2。因此,可以将上述 R_{f1} 、 R_{f2} 的范围内是否多出荧光斑点,作为炒白果仁配方颗粒鉴别点。

在本发明的一些实施方案中,所述方法还包括将对照品溶液和阴性溶液点涂于硅胶薄层板上的步骤。其中,对照品溶液用于确定样品中含有银杏内酯 B 和银杏内酯 C,阴性溶液用于排除对样品的干扰。

在本发明中,由于银杏内酯 A 的荧光斑点不清晰,综合考虑,所述对照品溶液中的对照品优选包括银杏内酯 B 和银杏内酯 C。所述对照品溶液优选取银杏内酯 B 对照品、银杏内酯 C 对照品,与甲醇混合后,即可得到对照品溶液。在本发明的一些具体实施方案中,优选按照以下步骤制备对照品溶液:

取银杏内酯 B 对照品、银杏内酯 C 对照品,加甲醇制成每 1 mL 各含 1 mg 的混合溶液,作为对照品溶液。

在本发明中，经检视后，供试品色谱中，在与对照品色谱相应的位置上，显相同颜色的荧光斑点，表明可以有效鉴别炒白果仁、炒白果仁配方颗粒。

所述阴性溶液可以按照下述方法制备：

取甲醇 1 mL 作为阴性溶液。

5 需要说明的是，在本发明中，经研究，将对照品溶液的点样量优选为 1~5 μL ，更优选为 2 μL ；所述阴性溶液的点涂量优选为 1~3 μL ，更优选为 1 μL 。

经多批次验证，本发明提供的上述薄层色谱鉴别方法，通过薄层色谱中的鉴别点 R_{f1} 和 R_{f2} ，能够快速、有效地鉴别出已失去饮片形态的炒白果仁配方颗粒，操作简便、精密度和灵敏度高、稳定性好，具有良好的应用前景。

10 为了进一步说明本发明，下面通过以下实施例进行详细说明。本发明以下实施例中所用的仪器包括加热板、研钵、半自动薄层点样仪：CAMAGLionmat-5、薄层成像系统：CAMAGTLCVisualizer、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）；所用的试剂包括甲苯、乙酸乙酯、甲醇、丙酮、醋酐均为分析
15 纯，水为超纯水（实验室自制）；所用的试药包括银杏内酯 B（中国食品药品检定研究院，批号：110863-201611），银杏内酯 C（四川省维克奇生物科技有限公司，批号：wkq18051108），白果仁配方颗粒（四川新绿色药业科技发展有限公司，批号：2209001；2209002；2209003）炒白果仁配方颗粒（四川新绿色药业科技发展有限公司，批号：2304047；2304048；2304049）。

20 制备例 1

本制备例提供一种白果配方颗粒、炒白果仁配方颗粒的供试品溶液的制备方法，包括以下步骤：

取本品（白果配方颗粒或炒白果仁配方颗粒）1 g，加水 20 mL，加热使其溶解，过滤，滤液浓缩至 5 mL，加入已处理好的聚酰胺柱（30~60 目，1 g，
25 内径为 1 cm，用水湿法装柱）上，用水 50 mL 洗脱，弃去水液用 40 mL 的 50 vol%乙醇洗脱，收集洗脱液，置水浴上蒸去乙醇，水液用乙酸乙酯（每次 20 mL）振摇提取 2 次，合并乙酸乙酯液，蒸干，残渣加甲醇 1 mL 使溶解，作为供试品溶液。

制备例 2

30 本制备例提供一种对照品溶液的制备方法，包括以下步骤：

取银杏内酯 B 对照品、银杏内酯 C 对照品，加甲醇制成每 1 mL 各含 1 mg 银杏内酯 B 对照品、银杏内酯 C 对照品的混合溶液，作为银杏内酯 B、银杏内酯 C 的混合对照品溶液（简称“对照品溶液”）。

制备例 3

5 本制备例提供一种阴性溶液的制备方法，包括以下步骤：

取甲醇 1mL 作为阴性溶液。

实施例 1

本实施例提供一种白果配方颗粒、炒白果仁配方颗粒的薄层鉴别色谱方法，并对点样量进行考察，包括以下步骤：

10 S1：按照制备例 1~2 的方法，提供白果配方颗粒的供试品溶液、炒白果仁配方颗粒的供试品溶液以及对照品溶液；

S2：各取白果配方颗粒的供试品溶液、炒白果仁配方颗粒的供试品溶液 15 μ L、20 μ L、25 μ L，取对照品溶液 1 μ L、2 μ L、5 μ L，照薄层色谱法(中国药典 2020 年版通则 0502)试验，分别点于同一硅胶 G 薄层板上，以三氯甲烷-环己烷-丙酮-冰乙酸（体积比为 10:5:5:2）为展开剂，在 25 $^{\circ}$ C，75 RH% 的环境下展开，取出，晾干，喷以醋酐溶液，在 140 $^{\circ}$ C 加热 30 分钟，置紫外光灯（365 nm）下检视。

结果如图 1 所示（1~3 对应对照品溶液的点样量为 1 μ L、2 μ L、5 μ L，4~6 对应白果仁配方颗粒溶液的点样量为 15 μ L、20 μ L、25 μ L，7~9 对应炒白果仁配方颗粒溶液的点样量为 15 μ L、20 μ L、25 μ L），可以看出，当对照品溶液点样量为 2 μ L，供试品溶液点样量为 20 μ L 时，薄层色谱荧光斑点显色清晰，因此，确定对照品溶液点样量为 2 μ L、供试品溶液点样量为 20 μ L。并且，与对照品的图谱比较，比移值（ R_{f1} ）为 0.65，比移值（ R_{f2} ）为 0.736 处炒白果仁配方颗粒有明显的荧光斑点，而白果仁配方颗粒无荧光斑点。因此，可以将 25 在比移值（ R_{f1} ）0.65，比移值（ R_{f2} ）0.736 处是否有荧光斑点作为鉴别点。

实施例 2

本实施例提供一种白果配方颗粒、炒白果仁配方颗粒的薄层鉴别色谱方法，并对专属性进行考察，包括以下步骤：

30 S1：按照制备例 1~3 的方法，提供白果配方颗粒的供试品溶液、炒白果仁配方颗粒的供试品溶液、对照品溶液以及阴性溶液；

S2: 各取白果配方颗粒的供试品溶液、炒白果仁配方颗粒的供试品溶液 20 μL , 取对照品溶液 1 μL , 取阴性溶液 1 μL , 照薄层色谱法(中国药典 2020 年版通则 0502)试验, 分别点于同一硅胶 G 薄层板上, 以三氯甲烷-环己烷-丙酮-冰乙酸(体积比为 10:5:5:2)为展开剂, 在 25 $^{\circ}\text{C}$, 75 RH%的环境下展开, 取出, 晾干, 喷以醋酐溶液, 在 150 $^{\circ}\text{C}$ 加热 30 分钟, 置紫外光灯(365 nm)下检视。

结果如图 2 所示, 可以看出阴性样品对白果仁、炒白果仁配方颗粒供试品无干扰, 该方法的专属性较好。与对照品的图谱比较, 比移值(R_{f1})为 0.7, 比移值(R_{f2})为 0.771 处炒白果仁配方颗粒有明显的荧光斑点, 而白果仁配方颗粒无荧光斑点。因此, 可以将比移值(R_{f1}) 0.7, 比移值(R_{f2}) 0.771 处是否有荧光斑点作为鉴别点。

实施例 3

本实施例提供一种白果配方颗粒、炒白果仁配方颗粒的薄层鉴别色谱方法, 并对耐用性(不同薄层板)进行考察, 包括以下步骤:

S1: 按照制备例 1~2 的方法, 提供白果配方颗粒的供试品溶液、炒白果仁配方颗粒的供试品溶液以及对照品溶液;

S2: 各取白果配方颗粒的供试品溶液、炒白果仁配方颗粒的供试品溶液 20 μL , 取对照品溶液 1 μL , 照薄层色谱法(中国药典 2020 年版通则 0502)试验, 分别点于硅胶 G 板(青岛海洋硅胶试剂厂)、硅胶 G 板(天津思利达科技有限公司)、默克硅胶 G 板上, 均以三氯甲烷-环己烷-丙酮-冰乙酸(体积比为 10:5:5:2)为展开剂, 在 25 $^{\circ}\text{C}$, 75 RH%的环境下展开, 取出, 晾干, 分别喷以醋酐溶液, 在 160 $^{\circ}\text{C}$ 加热 30 分钟, 置紫外光灯(365 nm)下检视。

结果见图 3~5, 图 3 为采用天津思利达科技有限公司的硅胶 G 板得到的薄层色谱图, 图 4 采用默克硅胶 G 板得到的薄层色谱图, 图 5 为采用青岛海洋硅胶试剂厂的硅胶 G 板得到的薄层色谱图。由图 3~5 可以看出, 3 个不同的硅胶 G 板均能达到鉴别要求, 表明该方法的耐用性良好。并且, 与对照品图谱比较, 三种不同硅胶 G 板下的比移值(R_{f1})为 0.7、0.658、0.7, 比移值(R_{f2})为 0.8、0.734、0.791 时, 炒白果仁配方颗粒有明显的荧光斑点, 而白果仁配方颗粒无荧光斑点。因此, 可以将比移值(R_{f1}) 0.7、0.658、0.7, 比移值(R_{f2}) 0.8、0.734、0.791 处是否有荧光斑点作为鉴别点。

实施例 4

本实施例提供一种白果配方颗粒、炒白果仁配方颗粒的薄层鉴别色谱方法，并对耐用性（不同温度）进行考察，包括以下步骤：

5 S1：按照制备例 1~2 的方法，提供白果配方颗粒的供试品溶液、炒白果仁配方颗粒的供试品溶液以及对照品溶液；

S2：各取白果配方颗粒的供试品溶液、炒白果仁配方颗粒的供试品溶液 20 μ L，取对照品溶液 1 μ L，照薄层色谱法(中国药典 2020 年版通则 0502)试验，分别点于同一硅胶 G 薄层板上，均以三氯甲烷-环己烷-丙酮-冰乙酸（体积比为 10:5:5:2）为展开剂，分别在低温 8℃和常温 25℃下展开（湿度为 75 RH%），
10 取出，晾干，分别喷以醋酐溶液，在 145℃加热 30 分钟，置紫外光灯（365 nm）下检视。

结果见图 6~7，图 6 为在低温 8℃下展开得到的薄层色谱图，图 7 为在常温 25℃下展开得到的薄层色谱图。由图 6~7 可看出，该方法对不同温度的耐用性较好。与对照品图谱比较，在低温 8℃和常温 25℃下展开的供试品图谱，
15 比移值（ R_{f1} ）为 0.6、0.6，比移值（ R_{f2} ）为 0.7、0.7 处炒白果仁配方颗粒有明显的荧光斑点，而白果仁配方颗粒无荧光斑点。因此，可以将比移值（ R_{f1} ）0.6、0.6，比移值（ R_{f2} ）0.7、0.7 处是否有荧光斑点作为鉴别点。

实施例 5

20 本实施例提供一种白果配方颗粒、炒白果仁配方颗粒的薄层鉴别色谱方法，并对耐用性（不同湿度）进行考察，包括以下步骤：

S1：按照制备例 1~2 的方法，提供白果配方颗粒的供试品溶液、炒白果仁配方颗粒的供试品溶液以及对照品溶液；

S2：各取白果配方颗粒的供试品溶液、炒白果仁配方颗粒的供试品溶液 20 μ L，取对照品溶液 1 μ L，照薄层色谱法(中国药典 2020 年版通则 0502)试验，
25 分别点于同一硅胶 G 薄层板上，均以三氯甲烷-环己烷-丙酮-冰乙酸（体积比为 10:5:5:2）为展开剂，在 32 RH%和 75 RH%的湿度环境下展开（温度为 25℃），取出，晾干，分别喷以醋酐溶液，在 145℃加热 30 分钟，置紫外光灯（365 nm）下检视。

30 结果见图 8~9，图 8 为在 32 RH%的湿度环境下展开得到的薄层色谱图，图 9 为在 75 RH %的湿度环境下展开得到的薄层色谱图。由图 8~9 可看出，该

方法对不同湿度的耐用性较好。与对照品图谱比较，在 32 RH%和 75 RH %的湿度环境下展开的供试品图谱，比移值 (R_{f1}) 为 0.6、0.6，比移值 (R_{f2}) 为 0.7、0.74 处炒白果仁配方颗粒有明显的荧光斑点，而白果仁配方颗粒无荧光斑点。因此，可以将在比移值 (R_{f1}) 0.6、0.6，比移值 (R_{f2}) 0.7、0.74 处是否有荧光斑点作为鉴别点。

实施例 6

本实施例对上述的薄层鉴别色谱方法进行验证，包括以下步骤：

S1：分别取对照品、3 批白果配方颗粒以及 3 批炒白果配方颗粒，按照制备例 1~2 的方法，提供相应对照品溶液、不同批次的白果配方颗粒的供试品溶液以及不同批次的炒白果仁配方颗粒的供试品溶液；

S2：各取不同批次的白果配方颗粒的供试品溶液、不同批次的炒白果仁配方颗粒的供试品溶液 20 μ L，取对照品溶液 1 μ L，照薄层色谱法(中国药典 2020 年版通则 0502)试验，分别点于同一硅胶 G 薄层板上，均以三氯甲烷-环己烷-丙酮-冰乙酸(体积比为 10:5:5:2)为展开剂，在 25 $^{\circ}$ C，75 RH%的环境下展开，取出，晾干，分别喷以醋酐溶液，在 145 $^{\circ}$ C加热 30 分钟，置紫外光灯(365 nm)下检视。

结果见图 10，可以看出，与对照品的图谱比较，不同批次的供试品溶液的图谱在比移值 (R_{f1}) 为 0.673，比移值 (R_{f2}) 为 0.74 处炒白果仁配方颗粒有明显的荧光斑点，白果仁配方颗粒无荧光斑点。因此，可以将在比移值(R_{f1}) 0.673，比移值 (R_{f2}) 0.74 处是否有荧光斑点作为鉴别点。

实施例 7

本实施例提供一种白果配方颗粒、炒白果仁配方颗粒的薄层鉴别色谱方法，与实施例 6 中的方法相比，区别仅在于，以体积比为 8:3:3:1.5 的三氯甲烷-环己烷-丙酮-冰乙酸作为展开剂，其余参数和步骤与实施例 1 保持一致。

结果见图 11，可以看出，与对照品的图谱比较，炒白果仁配方颗粒在比移值 (R_{f1}) 为 0.65，比移值 (R_{f2}) 为 0.74 处有明显的荧光斑点，白果仁配方颗粒无荧光斑点。因此，可以将在比移值 (R_{f1}) 0.65，比移值 (R_{f2}) 0.74 处是否有荧光斑点作为鉴别点。

实施例 8

本实施例提供一种白果配方颗粒、炒白果仁配方颗粒的薄层鉴别色谱方法，

与实施例 6 中的方法相比，区别仅在于，以体积比为 12:6:6:2.5 的三氯甲烷-环己烷-丙酮-冰乙酸作为展开剂，其余参数和步骤与实施例 1 保持一致。

结果见图 12，可以看出，与对照品的图谱比较，炒白果仁配方颗粒在比移值 (R_{f1}) 为 0.65，比移值 (R_{f2}) 为 0.77 处有明显的荧光斑点，白果仁配方颗粒无荧光斑点。因此，可以将在比移值 (R_{f1}) 0.65，比移值 (R_{f2}) 0.77 处是否有荧光斑点作为鉴别点。

白果配方颗粒、炒白果配方颗粒鉴别点 R_f 确定

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，确定炒白果仁配方颗粒鉴别斑点 1 比移值 (R_{f1}) 应在 10% 范围内，规定值为 0.648；炒白果仁配方颗粒鉴别点 2 比移值 (R_{f2}) 应在 10% 范围内，规定值为 0.741。

表 1

项目	鉴别点 1				鉴别点 2			
	比移值 R_{f1}	平均值	RSD %	范围	比移值 R_{f2}	平均值	RSD %	范围
点样量	0.65	0.648	6.9	0.58 ~ 0.71	0.736	0.741	4.9	0.67~0.82
专属性	0.700				0.771			
思利达薄层板	0.700				0.800			
默克薄层板	0.658				0.734			
青岛海洋薄层板	0.700				0.791			
不同温度-8℃	0.600				0.700			
不同温度-25℃	0.600				0.700			
不同湿度-32 RH%	0.600				0.700			
不同湿度-75 RH%	0.600				0.740			
不同批次验证	0.673				0.740			

对比例 1

S1：取白果仁配方颗粒、炒白果仁配方颗粒 1 g，研细，加水 30 mL 使溶解，用乙酸乙酯振摇提取 2 次，每次 20 mL，合并乙酸乙酯液，蒸干，残渣加甲醇 1 mL 使溶解，作为供试品溶液。另取银杏内酯 B 对照品、银杏内酯 C 对照品，加甲醇制成每 1 mL 各含 1 mg 的混合溶液，作为对照品溶液；

S2：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 8 μ L、对照品溶液 2 μ L，分别点于同一以含 4% 醋酸钠的羧甲基纤维素钠溶液为黏合剂的硅胶 G 薄层板上，以甲苯-乙酸乙酯-丙酮-甲醇（10:5:5:0.6）为展开剂，在 25℃，75 RH% 的环境下展开，取出，晾干，喷以醋酐，在 140℃

加热 30 分钟，置紫外光灯（365nm）下检视。

结果见图 13，采取上述薄层鉴别方法，白果仁、炒白果仁配方颗粒斑点无明显差异，因此无法有效区分白果仁配方颗粒和炒白果仁配方颗粒。

上述结果表明，采用非本发明提供的薄层方法，得到的薄层色谱无法对白
5 果仁配方颗粒和炒白果仁配方颗粒进行鉴别。

对比例 2

S1：按照制备例 1~2 的方法，提供白果配方颗粒的供试品溶液、炒白果仁
配方颗粒的供试品溶液以及对照品溶液；

S2：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
10 8 μ L、对照品溶液 2 μ L，分别点于同一硅胶 G 薄层板上，以三氯甲烷-环己烷-
丙酮-冰乙酸（10:10:5:2）为展开剂，在 25℃，75 RH%的环境下展开，取出，
晾干，喷以醋酐溶液，在 140~160℃加热 30 分钟，置紫外光灯（365nm）下
检视。

结果见图 14，可以看出，采用上述薄层鉴别方法，白果仁、炒白果仁配
15 方颗粒分离度较差，因此无法有效区分白果仁配方颗粒和炒白果仁配方颗粒。

上述结果表明，采用不在本发明比例范围内的展开剂，得到的薄层色谱无
法对白果仁配方颗粒和炒白果仁配方颗粒进行鉴别。

对比例 3

S1：按照制备例 1~2 的方法，提供白果配方颗粒的供试品溶液、炒白果仁
20 配方颗粒的供试品溶液以及对照品溶液；

S2：各取白果配方颗粒的供试品溶液、炒白果仁配方颗粒的供试品溶液
20 μ L，取对照品溶液 1 μ L，照薄层色谱法(中国药典 2020 年版通则 0502)试验，
分别点于同一硅胶 G 薄层板上，均以三氯甲烷-环己烷-丙酮-冰乙酸（体积比
为 5:7:3:1）为展开剂，在 25℃，75 RH%的环境下展开，取出，晾干，喷以醋
25 酐溶液，在 140~160℃加热 30 分钟，置紫外光灯（365 nm）下检视。

结果见图 15，可以看出采用上述薄层鉴别方法，白果仁、炒白果仁配
方颗粒分离度较差，因此无法有效区分白果仁配方颗粒和炒白果仁配方颗粒。

上述结果表明，采用不在本发明比例范围内的展开剂，得到的薄层色谱无
法对白果仁配方颗粒和炒白果仁配方颗粒进行鉴别。

30 所公开的实施例的上述说明，使本领域专业技术人员能够实现或使用本发

明。对这些实施例的多种修改对本领域的专业技术人员来说将是显而易见的，本文中所定义的一般原理可以在不脱离本发明的精神或范围的情况下，在其它实施例中实现。因此，本发明将不会被限制于本文所示的这些实施例，而是要符合与本文所公开的原理和新颖特点相一致的最宽的范围。

权 利 要 求 书

1、一种白果仁配方颗粒、炒白果仁配方颗粒的薄层色谱鉴别方法，其特征在于，包括以下步骤：

- 5 将供试品溶液点涂于硅胶薄层板上，按照薄层色谱条件进行展开，展开结束后加入显色剂，加热后，检视；

所述薄层色谱条件中的展开剂为三氯甲烷-环己烷-丙酮-冰乙酸，所述三氯甲烷、环己烷、丙酮、冰乙酸的体积比为(8~12):(3~6):(3~6):(1.5~2.5)。

- 2、根据权利要求1所述的方法，其特征在于，所述三氯甲烷、环己烷、
10 丙酮、冰乙酸的体积比为(10~12):(5~6):(5~6):2。

3、根据权利要求1所述的方法，其特征在于，所述供试品溶液的点样量为 15~25 μL 。

4、根据权利要求1所述的方法，其特征在于，所述展开的环境温度为 8~25 $^{\circ}\text{C}$ ，环境湿度为 32~75 RH%。

- 15 5、根据权利要求1所述的方法，其特征在于，检视的薄层色谱中，炒白果仁配方颗粒在比移值 R_{f1} 为 0.648 ± 0.0648 、比移值 R_{f2} 为 0.741 ± 0.0741 范围内有荧光斑点，白果仁配方颗粒无荧光斑点。

6、根据权利要求1所述的方法，其特征在于，所述检视在紫外线下进行；所述紫外线的波长为 365 nm。

- 20 7、根据权利要求1所述的方法，其特征在于，所述供试品溶液按照下述方法制备：

取供试品与水混合后，加热，过滤，将滤液采用柱层析处理，经水洗脱除去杂质后，用乙醇洗脱，收集洗脱液，除去乙醇后，加入乙酸乙酯提取，将乙酸乙酯液蒸干，残渣加甲醇，得到供试品溶液。

- 25 8、根据权利要求7所述的方法，其特征在于，所述乙醇为 50 vol% 的乙醇。

9、根据权利要求1所述的方法，其特征在于，所述方法还包括将对照品溶液和阴性溶液点涂于硅胶薄层板上的步骤。

10、根据权利要求9所述的方法，其特征在于，所述对照品溶液中的对照品包括银杏内酯 B 和银杏内酯 C；

所述对照品溶液的点样量为 1~5 μL ;
所述阴性溶液的点样量为 1~3 μL 。