

## 益肾养元颗粒中陈皮的鉴别和橙皮苷含量的测定\*

谭丹<sup>1</sup>, 朱迪<sup>1</sup>, 陆苑<sup>1,2</sup>, 王爱民<sup>1,3</sup>, 黄跃伟<sup>4</sup>, 李勇军<sup>1,3</sup>, 兰燕宇<sup>1,3\*\*</sup>

(1. 贵州医科大学药学院, 贵州 贵阳 550004; 2. 贵州医科大学贵州省药物制剂重点实验室, 贵州 贵阳 550004; 3. 贵州医科大学民族药与中药开发应用教育部工程研究中心, 贵州 贵阳 550004; 4. 贵州德良方药业股份有限公司, 贵州 兴义 562409)

**[摘要]** 目的: 建立益肾养元颗粒中陈皮的薄层色谱鉴别与橙皮苷含量的测定方法。方法: 采用薄层色谱法对陈皮的定性鉴别, 采用高效液相色谱法测定橙皮苷的含量; 色谱柱为迪马 C18 柱(150 × 4.6, 5 μm), 流动相为乙腈 - 0.1% 磷酸(20:80), 流速 1 mL/min, 柱温 45 °C, 检测波长 283 nm。结果: 薄层色谱鉴别斑点清晰, 阴性对照无干扰; 橙皮苷进样量为 0.114 ~ 2.29 μg, 与峰面积呈良好线性关系( $r=0.9994$ ), 平均回收率为 99.67%, 平均峰面积(RSD)为 2.1%。结论: 所建立的方法简便、准确、重复性好, 可用于益肾养元颗粒中陈皮的鉴别和橙皮苷的含量测定。

**[关键词]** 色谱法, 薄层; 益肾养元颗粒; 陈皮; 色谱法, 液相; 橙皮苷

**[中图分类号]** R927.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2015)10-1036-04

## Identification of *Pericarpium citri reticulatae* in Yishenyangyuan Granules with TLC and Determination of Hesperidin Content with HPLC

TAN Dan<sup>1</sup>, ZHU Di<sup>1</sup>, LU Yuan<sup>1,2</sup>, WANG Aimin<sup>1,3</sup>, HUANG Yuewei<sup>4</sup>, LI Yongjun<sup>1,3</sup>, LAN Yanyu<sup>1,3</sup>

(1. School of Pharmacy, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China; 2. Guizhou Provincial Key Laboratory of Pharmaceutics, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China; 3. Engineering Research Center for the Development and Application of Ethnic Medicine and TCM, Ministry of Education, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China; 4. Guizhou De Liangfang Pharmaceutical Co. Ltd., Xingyi 562409, Guizhou, China)

**[Abstract] Objective:** To establish the method for the identification of *Pericarpium citri reticulatae* in Yishenyangyuan granules and the hesperidin content determination. **Methods:** *Pericarpium citri reticulatae* were identified by TLC and the content of hesperidin was determined by HPLC. A Diamonsil C18 column (150 mm × 4.6 mm, 5 μm) was used with a mobile phase consisting of acetonitrile - 0.1% phosphoric acid (20:80) at a flow rate of 1.0 mL/min, the column temperature was 45 °C and the detection wave length was 283 nm. **Result:** The bilirubin spot of TLC were clear, and there was no interference in negative control. The sample size of hesperidin was in the range of 0.114 ~ 2.29 μg, demonstrating a good linear relationship with the peak area ( $r=0.9994$ ). The average recovery rate was 99.67%, and RSD was 2.1%. **Conclusion:** The above established methods were simple and accurate with good reproducible characteristic, which can be used for the identification of *Pericarpium citri reticulatae* and content determination of hesperidin in Yishenyangyuan granules.

**[Key words]** chromatography, thin layer; Yishenyangyuan granules; *Pericarpium citri reticulatae*; chromatography, liquid; hesperidin

\* [基金项目] 贵州省中药现代化专项项目[黔科合中药字(2013)5062号, 黔科合重G字(2013)4001]; 贵州省高等学校创新能力提升计划[黔教合协同创新字(2013)04]

\*\* 通信作者 E-mail: yanyu626@126.com

网络出版时间: 2015-09-11 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/52.5012.R.20150911.2322.064.html>

益肾养元颗粒系由制何首乌、狗脊、黄精、陈皮等八味中药经提取加工制成的颗粒剂,具有补益肝肾、健脾益气、涩精止遗的功效,临床用于治疗肝肾不足、脾气虚弱、面色萎黄、倦怠纳差、腰膝酸痛、遗精梦泄等症<sup>[1-2]</sup>。益肾养元颗粒中的陈皮具有治疗脘腹胀满,食少吐泄等症,所含黄酮类化合物为其主要成分<sup>[3-6]</sup>。目前尚未建立益肾养元颗粒中陈皮的鉴别以及橙皮苷的含量测定方法。为了进一步提高益肾养元颗粒的质量标准,确保临床患者用药的安全有效,对益肾养元颗粒中陈皮的 TLC 鉴别和含量测定进行研究,建立益肾养元颗粒中的陈皮的 TLC 鉴别和橙皮苷的含量测定方法。

## 1 仪器与试药

### 1.1 仪器

ULtiMate 3000 高效液相色谱仪、四元低压梯度泵、在线真空脱气机、自动进样器、色谱柱温箱、阵列二极管检测器,变色龙 6.8 色谱工作站(赛默飞世尔科技有限公司),安捷伦 Chemstation B.04.03 色谱工作站(处理色谱数据用),METTLER AE240 电子天平[梅特勒-脱利多仪器(上海)有限公司],REPROSTAR3 薄层色谱成像系统(瑞士 GAMAG),ZF-401 型可见紫外检测仪(上海顾村电光仪器厂),实验室专用超纯水机(四川沃特尔水处理设备有限公司),TGL-16G 离心机(上海安亭科学仪器厂)。

### 1.2 药物

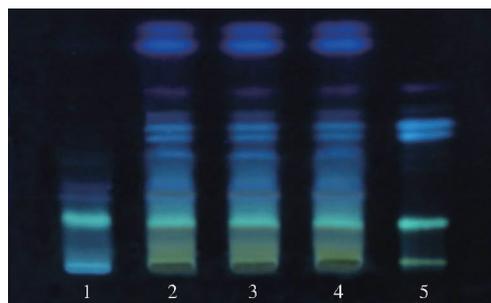
橙皮苷对照品(批号 110721-200613,供含量测定用,中国药品生物制品检定研究所)和陈皮对照药材(批号 120969-201109),均购于中国食品药品检定研究院,甲苯、乙酸乙酯、甲酸、甲醇、乙醇为分析纯,水为超纯水,聚酰胺(30~60 目)、硅胶 G 薄层板(青岛海洋化工厂);益肾养元颗粒 11 批由贵州德良方药业股份有限公司生产。

## 2 方法与结果

### 2.1 陈皮薄层色谱鉴别

取益肾养元颗粒 2 g,研细,加 70% 乙醇 30 mL,加热回流 1 h,滤过,滤液蒸干,残渣加水 20 mL 微热溶解,用正丁醇提取 2 次,每次 15 mL;合并正丁醇液,蒸干,残渣加乙醇 3 mL 溶解,加 0.5 g 聚酰胺(30~60 目)拌匀,水浴上挥去乙醇,加于聚酰胺

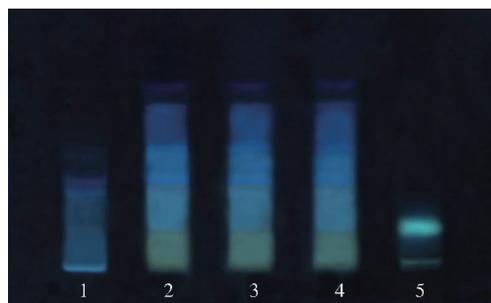
柱(30~60 目,1 g,内径 1.5 cm)上,用 30 mL 水洗脱,弃去水液;再用 25 mL 30% 乙醇洗脱,收集洗脱液,蒸干,残渣加甲醇 1 mL 溶解,作为供试品溶液。另取陈皮对照药材 0.1 g,同法制成陈皮对照药材溶液。取除陈皮外的其余成分按同法制成缺陈皮阴性对照液。照薄层色谱法(中国药典 2010 年版一部附录 VI B)试验,吸取供试品溶液与阴性对照溶液各 10  $\mu$ L,对照药材溶液 2  $\mu$ L,分别点于同一用 0.5% 氢氧化钠溶液制备的硅胶 G 薄层板上,成条带状,以乙酸乙酯-甲醇-水(100:17:13)为展开剂,展至约 3 cm,取出,晾干,再以甲苯-乙酸乙酯-甲酸-水(20:10:1:1)的上层溶液为展开剂,展至约 8 cm,取出,晾干,喷以三氯化铝试液,晾干,置紫外光灯(365 nm)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,阴性对照无干扰,见图 1。方法考察:将提取 1 h 后的样品加入甲醇再次回流 1 h,将提取液浓缩后照“2.1”所述薄层色谱条件检测是否还有橙皮苷存在,在与对照品色谱相应的位置上,几乎没有相同颜色的荧光斑点,见图 2。



注:1 为缺陈皮阴性样品,2~4 为供试品,5 为陈皮对照药材

图 1 各样品中陈皮薄层色谱

Fig. 1 TLC chromatograms of citrus in Yishenyanguan granules



注:1 为阴性对照,2~4 为供试品,5 为橙皮苷对照品

图 2 制剂中陈皮薄层色谱

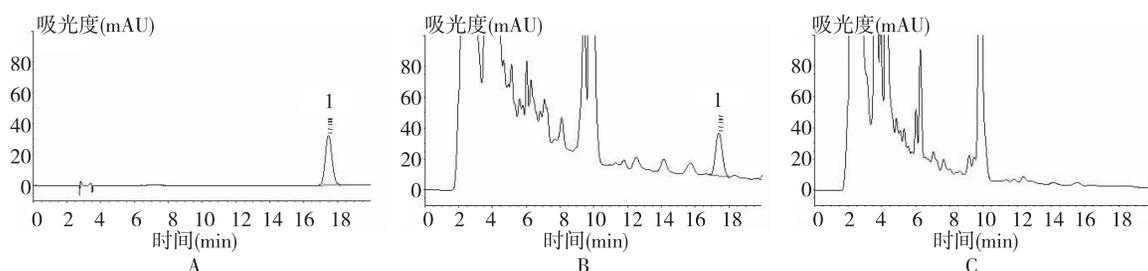
Fig. 2 TLC chromatograms of citrus in Yishenyanguan granules

2.2 橙皮苷含量测定

2.2.1 对照品、供试品以及阴性对照溶液的制备 精密称取橙皮苷对照品适量,精密称定,加甲醇溶解,制成每0.1 g/L的溶液,即得对照品溶液。取装量差异项下的本品,研细,取约2 g,精密称定,置烧瓶中,精密加甲醇25 mL,称定重量,加热回流1 h,放冷,再称定重量,用甲醇补足减失的重量,摇匀,滤过,精密吸取续滤液10 mL,蒸至近干,残渣用甲醇适量溶解并定容至2 mL,摇匀,即得供试品溶液。取缺陈皮阴性对照,按照“2.2.1”项供试品溶液制备方法制备缺陈皮阴性对照溶液。

2.2.2 色谱条件 色谱柱为迪马 C18 色谱柱(150 × 4.6, 5 μm),流动相为乙腈-0.1%磷酸(20:80),流速1 mL/min,柱温45 ℃;检测波长283 nm,进样5 μL。理论板数以橙皮苷峰计算应不低于7 000。

2.2.3 专属性试验 按照拟定的色谱条件吸取对照品溶液、供试品溶液和缺陈皮的阴性对照液各5 μL,注入高效液相色谱仪,记录色谱图。结果表明供试品色谱中,在与对照品色谱峰相应峰时处有色谱峰,且与相邻杂质峰充分分离;阴性对照无干扰,表明该方法专属性较好,见图3。



注:A为橙皮苷对照品,B为供试品,C为阴性对照,1为橙皮苷

图3 橙皮苷 HPLC 色谱

Fig. 3 HPLC chromatograms of hesperidin in Yishenyangyuan granules

2.2.4 线性关系考察 分别用自动进样器吸取每1 mL含0.114 4 mg橙皮苷对照品溶液1、3、5、7、10、15和20 μL,注入液相色谱仪中,测定,记录色谱图,以进样量(μg)为横坐标,峰面积为纵坐标,绘制工作曲线,得线性回归方程为: $Y = 1\,394.9 X - 46.3$ ,  $r = 0.999\,4$  ( $Y$ 为峰面积, $X$ 为进样量),结果表明橙皮苷进样量在0.114 ~ 2.29 μg时线性关系良好。

2.2.8 回收率试验 精密称取已知橙皮苷含量(0.285 9 mg/g)的样品共9份,每份约1 g,分别按所取样品量中橙皮苷量的50%、100%和150%精密加入对照品适量,按“2.2.1”项下方法制备供试液,测定并计算橙皮苷的回收率,见表1。

2.2.5 重复性试验 取同一批样品约2 g,9份,精密称定,按“2.2.2”项下方法分别制备9份供试品溶液,分别精密吸取5 μL注入高效液相色谱仪,结果显示,供试品取样量在1.5 ~ 2.5 g时,平均含量为0.285 mg/g, RSD为2.7%,表明本方法重复性良好。

2.2.6 精密度试验 取同一供试品,按供试品溶液制备方法制备供试液,连续进样5次,每次5 μL。结果显示,供试品溶液中橙皮苷平均峰面积(RSD)为0.59%,表明仪器精密度良好。

2.2.7 稳定性试验 取同一供试品,按供试品溶液制备方法制备供试液,分别于0、1、4、8、16 h进样5 μL,测定峰面积,结果显示,供试品溶液中橙皮苷 RSD为0.59%,表明供试品溶液在16 h内稳定性良好。

表1 回收率试验结果

Tab. 1 Results of recovery experiment

| 称量 (g)  | 含量 (mg) | 加入量 (mg) | 测得量 (mg) | 回收率 (%) | 平均值 (%) | RSD (%) |
|---------|---------|----------|----------|---------|---------|---------|
| 1.001 5 | 0.286 3 | 0.114 4  | 0.400 4  | 99.71   |         |         |
| 1.010 3 | 0.288 8 | 0.114 4  | 0.405 1  | 101.60  |         |         |
| 1.007 9 | 0.288 2 | 0.114 4  | 0.402 2  | 99.71   |         |         |
| 1.003 8 | 0.287 0 | 0.228 8  | 0.510 4  | 97.63   |         |         |
| 1.004 6 | 0.287 2 | 0.228 8  | 0.512 9  | 98.65   | 99.67   | 2.1     |
| 1.016 3 | 0.290 6 | 0.228 8  | 0.511 3  | 96.47   |         |         |
| 1.082 6 | 0.309 5 | 0.343 2  | 0.648 5  | 98.76   |         |         |
| 1.027 2 | 0.293 7 | 0.343 2  | 0.642 7  | 101.70  |         |         |
| 1.034 5 | 0.295 8 | 0.343 2  | 0.648 5  | 102.80  |         |         |

2.2.9 制剂中橙皮苷含量测定 精密称取本品11批样品,按“2.2.1”项下方法制备供试品溶液分别精密吸取供试品溶液和对照品溶液各5 μL,注入液相色谱仪,记录峰面积,计算样品中橙皮苷含量。11批制剂中橙皮苷的含量测定结果见表2。

表 2 益肾养元颗粒中橙皮苷含量测定

Tab. 2 Results of content determination of hesperidin in the Yishenyangyuan granules

| 编号 | 批号       | 称量(g)   | 含量<br>(mg/g) | 平均值<br>(mg/g) | 每袋含量<br>(mg) |
|----|----------|---------|--------------|---------------|--------------|
| 1  | 20130101 | 2.105 3 | 0.256 8      | 0.260 1       | 1.040        |
|    |          | 2.073 9 | 0.263 3      |               |              |
| 2  | 20130109 | 2.100 4 | 0.316 1      | 0.320 0       | 1.280        |
|    |          | 2.083 6 | 0.323 8      |               |              |
| 3  | 20130201 | 2.097 6 | 0.217 0      | 0.220 2       | 0.881        |
|    |          | 2.087 3 | 0.223 4      |               |              |
| 4  | 20130301 | 2.011 8 | 0.245 8      | 0.245 0       | 0.980        |
|    |          | 2.094 1 | 0.244 1      |               |              |
| 5  | 20130403 | 2.007 8 | 0.291 0      | 0.290 6       | 1.160        |
|    |          | 2.018 9 | 0.290 1      |               |              |
| 6  | 20130404 | 1.951 4 | 0.268 7      | 0.278 0       | 1.110        |
|    |          | 2.005 4 | 0.287 4      |               |              |
| 7  | 20130405 | 2.056 2 | 0.336 9      | 0.335 3       | 1.340        |
|    |          | 2.087 7 | 0.333 6      |               |              |
| 8  | 20130901 | 2.066 3 | 0.300 4      | 0.304 7       | 1.220        |
|    |          | 2.043 2 | 0.309 0      |               |              |
| 9  | 20131002 | 2.054 1 | 0.242 4      | 0.243 6       | 0.974        |
|    |          | 2.080 2 | 0.244 8      |               |              |
| 10 | 20131003 | 2.077 9 | 0.249 3      | 0.250 3       | 1.000        |
|    |          | 2.031 5 | 0.251 3      |               |              |
| 11 | 20131004 | 2.139 4 | 0.327 8      | 0.330 9       | 1.320        |
|    |          | 2.085 2 | 0.333 9      |               |              |

### 3 讨论

陈皮的定性鉴别样品制备曾采用甲醇提取<sup>[7-8]</sup>,甲醇提取后用正丁醇或乙酸乙酯萃取等方法<sup>[9]</sup>,均未取得较好鉴别效果。最后采用甲醇提取后正丁醇萃取,继用聚酰胺富集的方法制备样品进行鉴别,结果表明,制剂和对照药材有多个斑点对应,显色清晰,阴性对照无干扰,经多批次试验,均能较好重现。

制剂中陈皮药材为提取物,其所含的橙皮苷溶解于甲醇中<sup>[10]</sup>,因此试验采用以甲醇为溶剂加热

回流提取制剂中的橙皮苷,经薄层鉴别考察,采用甲醇加热回流提取 1 h 可将制剂样品中橙皮苷提取完全。

益肾养元颗粒原质量标准鉴别项收载了何首乌、狗脊、金樱子、补骨脂的薄层色谱鉴别,含量测定项收载了何首乌中大黄素的高效液相色谱法测定。根据国家食品药品监督管理局药品审评中心的补充资料通知,为了进一步提高益肾养元颗粒的质量标准,本试验在原标准的基础上经研究,增加了制剂中陈皮的薄层色谱鉴别和橙皮苷的高效液相含量测定方法,以使质控标准更趋完善,更有效地控制了益肾养元颗粒的质量。

### 4 参考文献

- [1] 迟明艳,何峰,黄勇,等. 益肾养元颗粒的薄层鉴别方法研究[J]. 贵阳医学院学报, 2014(1):43-45.
- [2] 兰燕宇,王爱民,何迅,等. 益肾养元颗粒中大黄素的含量测定[J]. 贵阳医学院学报, 2005(5):31-32.
- [3] 童红梅. 陈皮中黄酮类化合物药理作用研究进展[J]. 山西中医学院学报, 2010(3):75-76.
- [4] 赵秀玲. 陈皮生理活性成分研究进展[J]. 食品工业科技, 2013(12):376-381.
- [5] 邓锋,梁蔚阳. 陈皮质量研究进展[J]. 今日药学, 2012(10):638-640.
- [6] 曹铭希. 陈皮中橙皮苷的提取及其药理活性的研究进展[J]. 中国医药指南, 2012(12):452-454.
- [7] 阎雪梅,贾凡. 扶肾颗粒质量标准研究[J]. 天津中医药大学学报, 2011(4):234-237.
- [8] 缪建春,蔡威黔. 克感灵片的薄层色谱鉴别[J]. 中国药师, 2011(7):1052-1053.
- [9] 熊泽,徐红霞,邵伟,等. 养荣丸(浓缩丸)质量标准研究[J]. 中成药, 2010(6):1070-1073.
- [10] 吕建伟,唐勇琛,陈惠红,等. 弱视明口服液的薄层色谱鉴别研究[J]. 现代中西医结合杂志, 2012(6):1786.

(2015-04-12 收稿,2015-08-19 修回)

中文编辑: 文箬颖; 英文编辑: 刘 华