

养阴口香合剂中枳壳的质量控制研究 *

郭璐玫¹, 刘兴鹏^{1△}, 陈文碧², 姜 莲¹, 陈 凤¹

(1. 贵州省食品药品检验所, 贵州 贵阳 550004; 2. 贵州万顺堂药业有限公司, 贵州 贵阳 550018)

摘要: **目的** 研究并控制养阴口香合剂中枳壳的质量。**方法** 采用薄层色谱法对枳壳进行鉴别研究; 采用高效液相色谱法测定枳壳中柚皮苷和新橙皮苷的含量, 色谱柱为 Waters Xbridge C18 柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-水 (20 : 80), 柱温为 30 ℃, 流速为 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 283 nm。**结果** 薄层色谱斑点清晰, 分离度较好; 高效液相色谱测定柚皮苷对照品在 0.05680 μg~0.7100 μg 范围内线性关系良好 ($r=0.9999$), 平均回收率为 100.21%; 新橙皮苷对照品在 0.03053 μg~0.3817 μg 范围内线性关系良好 ($r=0.9999$), 平均回收率为 98.33%。**结论** 本研究方法准确可靠, 重复性好, 可用于养阴口香合剂中枳壳的质量控制。

关键词: 养阴口香合剂; 枳壳; 薄层色谱法; 柚皮苷; 新橙皮苷; 高效液相色谱法

中图分类号: R286.0 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-2723(2019)01-0089-05

DOI: 10.19288/j.cnki.issn.1000-2723.2019.01.019

Quality Control of *Aurantii Fructus* in Yangyin Kouxiang Mixture

GUO Lumei¹, LIU Xingpeng¹, CHEN Wenbi², JIANG Lian¹, CHEN Feng¹

(1. Guizhou Institute for Food and Drug Control, Guiyang 550004, China;

2. Guizhou Wanshantang Pharmaceutical Co., Ltd. Guiyang 550018, China)

ABSTRACT: **Objective** To study and control quality of *Aurantii Fructus* in Yangyin Kouxiang Mixture. **Methods** Thin layer chromatography (TLC) was used for qualitative identification of *Aurantii Fructus*. High performance liquid chromatography (HPLC) was used for content determination of naringin and neohesperidin in *Aurantii Fructus* (AF) on a Waters Xbridge C18 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), and the mobile phase was acetonitrile-water (20 : 80) at the column temperature of 30 ℃. The flow rate was 1.0 mL·min⁻¹ and the detection wavelength was 283 nm. **Results** The TLC spots were clear and showed a good separation. HPLC showed the calibration curve of naringin had a good linear relationship in the mass range of 0.05680 μg ~ 0.7100 μg ($r=0.9999$) and the average recovery was 100.21%; the calibration curve of neohesperidin had a good linear relationship in the mass range of 0.03053 μg ~ 0.3817 μg ($r=0.9999$) and the average recovery was 98.33%. **Conclusion** The method is accurate with good reproducibility, which can be used for the quality control of *Aurantii Fructus* in Yangyin Kouxiang Mixture.

KEY WORDS: Yangyin Kouxiang Mixture; *Aurantii Fructus*; TLC; naringin; neohesperidin; HPLC

养阴口香合剂为传统中药方剂,已被收载于国家中成药标准汇编内科脾胃分册。它由石斛、枳壳、茵陈、黄芩、蓝布正、龙胆、麦冬、天冬、枇杷叶、黄精、生地黄、朱砂根 12 味药材组成,具有清胃泻火,滋阴生津,行气消积之功效。全方组织配伍开合相济,生机灵

动,滋阴而不呆滞,祛邪留有出路。烦热多属于虚,以地黄、麦冬、天冬、石斛、黄精清热滋阴药之甘,治肾胃之虚热,泻而兼补也;茵陈、黄芩之苦寒折热而去湿;火热上行为患,故又以枳壳、枇杷叶抑而降之^[1]。

传统中医将养阴口香合剂用于胃热津亏,阴虚郁

收稿日期: 2019-01-03

* 基金项目: 国家药典委员会国家药品标准提高行动计划项目(编号:554)

第一作者简介: 郭璐玫(1987-),女,硕士,主管药师,研究方向:中药检验及质量研究。

△通信作者: 刘兴鹏, E-mail: 24617309@ qq.com

热上蒸所致的口臭,口舌生疮,齿龈肿痛,咽干口苦,胃灼热痛,肠燥便秘^[2]。现代医学将其用于治疗慢性萎缩性胃炎,对急性胰岛素抵抗小鼠胰岛素敏感指数的影响等方面的研究有文献报道^[3-4]。

枳壳是养阴口香合剂中主降胃气的主要药味,归脾、胃经,能理气宽中,行气消滞^[5]。枳壳为传统中医药中常用的中药之一,使用已有数千年的历史。近年来体内外实验研究表明枳壳不同部位具有调节胃肠功能^[6]、抗凝血^[7]、抗抑郁^[8]、抗缺血^[9]、降低门脉高压^[10]和免疫调节^[11]等药理学作用。

传统中药已经在我国临床应用了数千年。由于其独特的理论和悠久的临床实践,在世界范围内受到越来越多的关注。但不可控制的质量是制约传统中药现代化和全球化的瓶颈^[12]。目前,在养阴口香合剂质量控制中,缺少对枳壳的质量控制现行标准。因此,本实验研究旨在为生产企业和管理部门对其质量控制制定现行标准,提高对养阴口香合剂的质量控制,保证药品质量和临床疗效,提高技术参考。

1 仪器与材料

1.1 仪器 ThermoFisher Ultimate3000(DAD)液相色谱仪;CAMAG 薄层点样仪;瑞士梅特勒托利多 AE200 型(十万分之一)和 XP26 型(百万分之一)电子天平;millipore 超纯水机制备超纯水。

1.2 材料 养阴口香合剂(贵州万顺堂药业有限公司);柚皮苷对照品(中国食品药品检定研究院,批号:110722-201815,含量以 91.7%计);新橙皮苷(中国食品药品检定研究院,批号:111857-201102,含量以 99.6%计);枳壳对照药材(中国食品药品检定研究院,批号:120981-201605);乙腈为色谱纯;超纯水;其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 枳壳的 TLC 定性鉴别 本实验以枳壳对照药材为指标物质,建立养阴口香合剂中枳壳的薄层色谱鉴别方法。

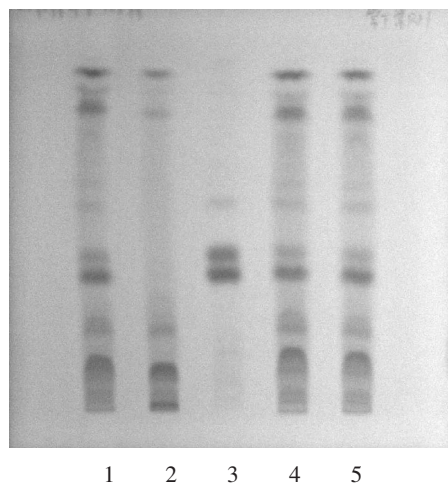
2.1.1 供试品溶液的制备^[13] 取本品 10 mL,用乙酸乙酯提取 2 次,每次 10 mL,合并乙酸乙酯液,蒸干,残渣用乙醇 2 mL 使溶解,作为供试品溶液。

2.1.2 缺枳壳阴性对照品溶液的制备 按处方比例称取除枳壳外其他药材,制成缺枳壳的阴性样品,同“2.1.1”项下方法制备缺枳壳的阴性对照品溶液。

2.1.3 枳壳对照药材溶液的制备 取枳壳对照药材 1 g,加水 20 mL,加热回流 1 h,用脱脂棉过滤,滤液置分液漏斗中,同“2.1.1”项下方法制得枳壳对照药材溶液。

2.1.4 TLC 色谱条件及检视方法 照薄层色谱法(《中国药典》2015 年版四部通则 0502)试验,吸取上述三种溶液各 5 μ L,分别点于同一硅胶 G 板上,以二氯甲烷-甲醇-水(10:6:2)的下层溶液为展开剂,展开,取出,晾干,喷以 5%三氯化铁乙醇溶液,置日光下检视。

2.1.5 枳壳 TCL 鉴别结果 供试品色谱中,在与枳壳对照药材色谱相应的位置上,显相同的颜色斑点,且缺枳壳的阴性对照品无干扰(图 1)。



1,4,5 养阴口香合剂供试品; 2 缺枳壳阴性对照品; 3 枳壳对照药材

图 1 TCL 方法对养阴口香合剂中枳壳的定性鉴别

2.2 枳壳含量的 HPLC 测定 本实验参照现行药典中枳壳的含量测定,选取柚皮苷和新橙皮苷为指标成分,建立养阴口香合剂中枳壳的含量测定^[14]。

2.2.1 色谱条件 色谱柱:Waters Xbridge C18 柱(250 mm $\times$ 4.6 mm,5 μ m);流动相:乙腈-水^[14](20:80);检测波长:283 nm;柱温:30 $^{\circ}$ C;流速:1.0 mL $\cdot$ min⁻¹;进样量:10 μ L。理论塔板数按柚皮苷峰计,应不低于 3 000。

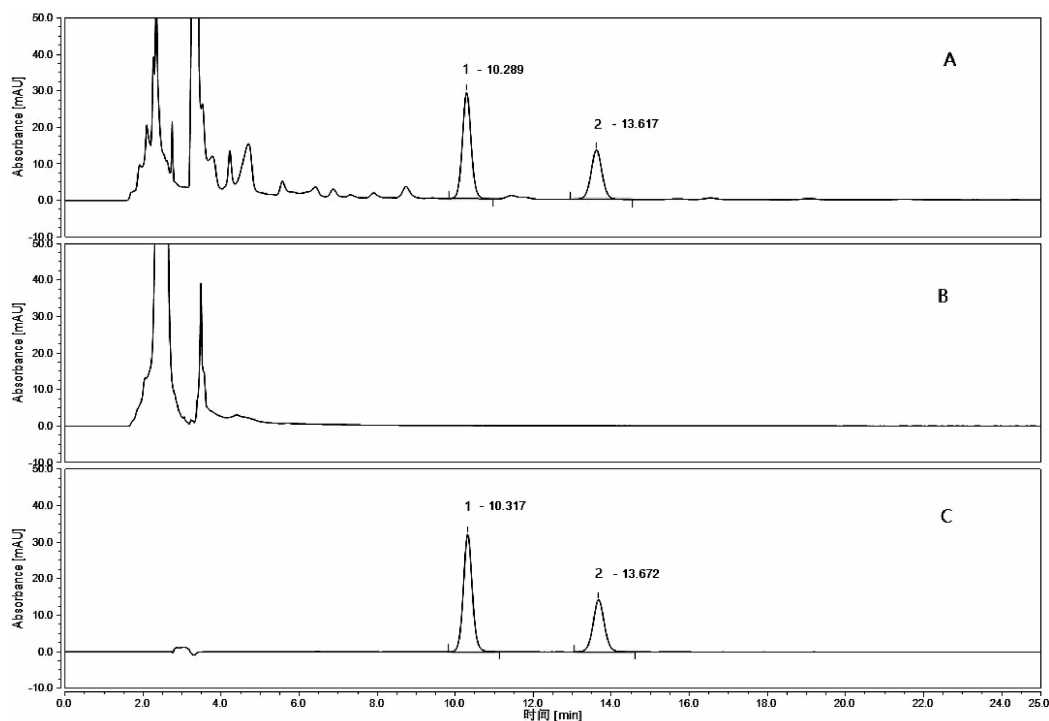
2.2.2 对照品溶液的制备 取柚皮苷和新橙皮苷对照品适量,精密称定,加 50%乙醇溶液制成每 1 mL 含柚皮苷 30 μ g、新橙皮苷 15 μ g 的混合溶液,即得。

2.2.3 供试品溶液的制备 取本品内容物,混匀,精密量取 2 mL,置 50 mL 量瓶中,加 50%乙醇适量,振

摇使之混匀并定容到刻度,摇匀后过滤,精密量取续滤液 5 mL,置 25 mL 量瓶中,加 50%乙醇定容至刻度,摇匀,用 0.45 μm 的滤头滤过,即得。

2.2.4 阴性对照品溶液的制备 取缺枳壳阴性样品,按“2.2.3”项下方法制备阴性对照品溶液,即得。

2.2.5 专属性考察 取混合对照品溶液、养阴口香合剂供试品溶液及阴性对照品溶液各 10 μL ,按“2.2.1”项下色谱条件注入液相色谱仪,供试品溶液色谱在与对照品溶液色谱相应位置有相应的色谱峰,且阴性无干扰,见图 2。



1 柚皮苷;2 新橙皮苷;A 供试品 ;B 阴性对照品 ;C 混合对照品

图2 养阴口香合剂中枳壳含量 HPLC 测定

2.2.6 线性关系考察^[15] 精密取混合对照品溶液 2 μL , 5 μL , 7 μL , 10 μL , 15 μL , 20 μL , 25 μL 依次注入液相色谱仪,测定峰面积。以对照品进样量(μg)为横坐标,峰面积为纵坐标,进行线性回归计算,绘制工作曲线,得出线性回归方程为:柚皮苷 $y=1,814.6054x + 0.8978$, $r=0.9999$,在 0.05680 μg ~0.7100 μg 的范围内线性关系良好;新橙皮苷 $y=3375.1357x+0.8978$, $r=0.9999$,在 0.03053 μg ~0.3817 μg 的范围内线性关系良好。

2.2.7 精密度试验 精密吸取同一混合对照品对照品溶液 10 μL ,连续进样 6 次,记录色谱图峰面积,柚皮苷对照品的峰面积 RSD 为 0.1%,新橙皮苷对照品的峰面积 RSD 为 0.1%,结果说明仪器精密度良好。

2.2.8 重复性试验 取同一批养阴口香合剂,按“2.2.3”项下供试品溶液制备方法制备 6 份,按“2.2.1”色谱条件测定含量,结果测得柚皮苷的平均

含量为 3.1306 mg/mL,RSD%为 0.3%,新橙皮苷的平均含量为 1.7753 mg/mL,RSD%为 0.3%,表明方法重复性良好。

2.2.9 稳定性试验 取养阴口香合剂供试品溶液,按“2.2.1”项下色谱条件,于 0 h、4 h、8 h、12 h、18 h、24 h,测定峰面积,柚皮苷的 RSD%为 0.2%,新橙皮苷的 RSD%为 0.3%,说明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.2.10 回收率试验^[16] 取已测定含量的养阴口香合剂(柚皮苷含量 3.1306 mg/mL,新橙皮苷含量 1.7753 mg $\cdot\text{mL}^{-1}$) 1 mL,置 50 mL 量瓶中,精密加入柚皮苷和新橙皮苷混合对照品溶液(含柚皮苷 0.1245 mg $\cdot\text{mL}^{-1}$ 、含新橙皮苷 0.07236 mg $\cdot\text{mL}^{-1}$) 25 mL,振摇混匀,按“2.2.3”项下方法制备样品溶液,并按“2.2.1”色谱条件测定柚皮苷和新橙皮苷的含量,计算各自成分的回收率,见表 1 和表 2,说明有较好回收率。

表 1 柚皮苷回收率试验($n=6$)

试验次数	样品取样量/mL	样品中新橙皮苷含量/mg	加入对照品量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
1	1	3.1306	3.1125	6.2354	99.12	100.21	1.0
2	1	3.1306		6.2474	99.50		
3	1	3.1306		6.2705	100.24		
4	1	3.1306		6.3017	101.23		
5	1	3.1306		6.2516	99.63		
6	1	3.1306		6.3117	101.55		

表 2 新橙皮苷回收率试验($n=6$)

试验次数	样品取样量/mL	样品中新橙皮苷含量/mg	加入对照品量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
1	1	1.7753	1.8090	3.5348	97.27	98.33	0.9
2	1	1.7753		3.5425	97.69		
3	1	1.7753		3.5543	98.35		
4	1	1.7753		3.5723	99.34		
5	1	1.7753		3.5448	97.82		
6	1	1.7753		3.5756	99.52		

2.2.11 样品含量测定 取 15 批养阴口香合剂,按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,按“2.2.1”项下色谱条件进样测定,见表 3。

表 3 样品测定结果($n=15$)

批号	柚皮苷含量/($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)	新橙皮苷含量/($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)
160503	3.1383	1.7049
160819	4.0632	2.1340
161020	3.9669	2.0615
161220	3.8447	2.0240
170315	3.4614	2.0703
170612	3.7150	2.3094
170908	3.5285	2.1578
170915	3.5560	2.1779
171020	3.4867	2.1254
171212	3.5286	2.1599
180314	3.6263	1.9595
180420	2.9571	2.3163
180917	2.4921	1.8225
181207	3.0156	1.6800
190105	3.1819	1.7853

3 讨论

3.1 枳壳的 TLC 定性鉴别 本实验供试品溶液的制

备对比了取样品蒸干后直接用甲醇溶解^[14]和取样品用乙酸乙酯萃取,发现乙酸乙酯萃取的供试品溶液易点样,展开后斑点圆整无拖尾。展开剂对比了二氯甲烷-甲醇-水(13:6:2)的下层溶液和正己烷-乙酸乙酯(2:3)^[17],显示前者的分离效果较好。显色方式对比了喷以 3%三氯化铝乙醇溶液和 5%三氯化铁乙醇^[18]溶液,结果后者斑点清晰无干扰。

3.2 枳壳含量的 HPLC 测定 枳壳的 HPLC 含量测定研究中,取对照品溶液在 200~400nm 波长范围内进行紫外扫描波长,柚皮苷和新橙皮苷在 283nm 处均有最大吸收,且分离度较好,故确定检测波长为 283nm。研究比较了乙腈-水(20:80)、乙腈-0.1%磷酸溶液(20:80)^[19]与甲醇-0.3%乙酸^[20]的洗脱效果,结果乙腈-水(20:80)为流动相的峰型和分离度较好,且简便,故采取乙腈-水(20:80)作为流动相。

本实验还研究了供试品的提取溶剂,采用水、甲醇、50%甲醇、乙醇、50%乙醇对养阴口香合剂进行提取,结果表明,以 50%乙醇为溶剂,峰形好,杂峰较少,分离度好,提取效率较高,故选用 50%乙醇为提取溶剂。本研究结果表明采用高效液相色谱测定柚皮苷对照品在 0.05680 μg ~0.7100 μg 范围内线性关系良好($r=0.9999$),平均回收率为 100.21%;新橙皮苷对照品在 0.03053 μg ~0.3817 μg 范围内线性关系良好($r=0.9999$),平均回收率为 98.33%。

4 小结

本实验对养阴口香合剂中枳壳的质量控制研究所采用的 TLC 鉴别及 HPLC 含量测定,方法准确可靠、重复性好、简便易行,能够较全面、可靠地控制养阴口香合剂中枳壳的质量,为生产企业和管理部门鉴定、检测和制定质量标准,提供数据和技术支撑。

参考文献:

- [1] 吴筑华. 苗药养阴口香合剂对代谢综合征的防治[J]. 中国民族医药杂志,2012,18(8):40-43.
- [2] 杨培民,孙洪胜,姚莉. 最新中成药手册[M]. 济南:山东科学技术出版社,2014:666.
- [3] 曾韦苹,伊凡,郭红梅,等. 养阴活胃合剂治疗慢性萎缩性胃炎的临床疗效观察 [J]. 新疆医科大学学报,2015,38(2):133-136.
- [4] 魏宝珍. 养阴活胃合剂治疗慢性萎缩性胃炎疗效观察[J]. 亚太传统医药,2015,11(11):139-140.

- [5] 黄伟. 来源于酸橙的枳实、枳壳品质评价体系研究[D]. 成都:成都中医药大学, 2011.
- [6] JIANG Y H, BAI X W, ZHU X L, et al. The effects of Fructus Aurantii extract on the 5-hydroxytryptamine and vasoactive intestinal peptide contents of the rat gastrointestinal tract[J]. *Pharm Bio*, 2014, 52(5):581-585.
- [7] TAN W, LI Y, WANG Y, et al. Anti-coagulative and gastrointestinal motility regulative activities of Fructus Aurantii Immaturus and its effective fractions [J]. *Biomedicine & pharmacotherapy*, 2017(90):244-252.
- [8] ZHANG Y J, HUANG W, HUANG X, et al. Fructus Aurantii induced antidepressant effect via its monoaminergic mechanism and prokinetic action in rat [J]. *Phytomedicine*, 2012, 19(12):1101-1107.
- [9] KANG M, KIM J H, CHO C, et al. Anti-ischemic effect of Aurantii Fructus on contractile dysfunction of ischemic and reperfused rat heart[J]. *J Ethnopharmacol*, 2007, 111(3):584-591.
- [10] HUANG Y T, WANG G F, CHEN C F, et al. Fructus aurantii reduced portal pressure in portal hypertensive rats[J]. *Life Sci*, 1995, 57(22):2011-2020.
- [11] SHU Z, YANG Y, XING N, et al. Structural characterization and immunomodulatory activity of a pectic polysaccharide(CALB-4) from Fructus aurantii[J]. *Int J Biol Macromol*, 2018(116):831-839.
- [12] JIANG Y, DAVID B, TU P, et al. Recent analytical approaches in quality control of traditional Chinese medicines—a review[J]. *Anal Chim Acta*, 2009, 657(1):9-18.
- [13] 崔燕兵, 邢志霞, 林帅军, 等. 乙肝益气解郁颗粒处方药材 TLC 鉴别方法研究[J]. *光明中医*, 2017, 32(20):2933-2935.
- [14] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 北京:中国医药科技出版社, 2015:246, 482-483, 1172-1173.
- [15] 王永盛, 彭善贵, 雷蕾. 木香槟榔丸中枳壳的质量控制研究[J]. *成都医学院学报*, 2018, 13(4):413-416.
- [16] 罗晖明, 丁野, 李文莉, 等. 四磨汤口服液质量标准补充研究[J]. *中国药事* 2014, 28(3):268-273.
- [17] 马俊, 杨更亮, 曹红, 等. 和中理脾丸的质量标准研究[J]. *解放军药学学报*, 2008, 24(5):401-404.
- [18] 梁光义. 中药化学 [M]. 北京: 中医古籍出版社, 2005: 128.
- [19] 苏丹. HPLC 法同时测定舒肝平胃丸中柚皮苷、橙皮苷和新橙皮苷的含量[J]. *天津药学*, 2018, 30(4):12-15.
- [20] 张永州, 宋晓勇. 高效液相法测定四磨汤口服液中柚皮苷含量方法改进 [J]. *白求恩医学院学报*, 2010, 8(4):299-300.