

## 论著

文章编号:1000-5404(2012)20-2078-04

### 消疹止痒胶囊有效成分的定性鉴别和含量测定方法研究

红梅<sup>1</sup>,王栋<sup>2</sup>,张勇<sup>1</sup>,包丽丽<sup>1</sup> (010010 呼和浩特,内蒙古自治区人民医院药学处<sup>1</sup>;010010 呼和浩特,内蒙古食品药品检验所中药科<sup>2</sup>)

**[摘要]** 目的 建立消疹止痒胶囊中药材的定性鉴别方法和指标成分的含量测定方法。方法 采用薄层色谱法对方中的诃子、麻黄进行定性鉴别;采用高效液相色谱法(HPLC)测定川芎中阿魏酸的含量。结果 该鉴别方法专属性强,薄层色谱斑点清晰,阴性对照无干扰;阿魏酸的 HPLC 色谱峰与其他色谱峰分离良好,进样量在 0.053 8~0.322 8 μg 范围内呈良好线性关系( $r=0.999\ 9$ ),平均加样回收率为 100.30%,RSD=0.96%( $n=9$ )。结论 本方法简便、准确、重现性好,可用于消疹止痒胶囊的质量控制。

**[关键词]** 消疹止痒胶囊;阿魏酸;薄层色谱法;高效液相色谱法;质量标准

**[中图分类号]** R289.5;R926;R944.5

**[文献标志码]** A

### Identification of active ingredients and determination of contents in Xiaozhen Zhiyang capsule

Hong Mei<sup>1</sup>, Wang Dong<sup>2</sup>, Zhang Yong<sup>1</sup>, Bao Lili<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Department of Pharmacy, Inner Mongolia People's Hospital, <sup>2</sup>Department of Chinese Medicine, Inner Mongolia Institute for Food and Drug Control, Hohhot, Inner Mongolia Autonomous Region, 010010, China)

**[Abstract]** **Objective** To identify 2 active ingredients and determine the contents of ferulic acid in Xiaozhen Zhiyang capsules. **Methods** Thin layer chromatography (TLC) was used for qualitative identification of chebula Fructus, and Ephedrae Herba. The content of Ferulic acid from *Rhizoma Chuanxiong* was determined by HPLC. **Results** The identification method was of high specificity with clear thin layer chromatography spots. The negative control did not impose any disturbance. In HPLC, the chromatographic peak of ferulic acid was well isolated from other peaks. There was a good linear relationship between the peak area and the sample size in a range of 0.053 8 to 0.322 8 μg ( $r=0.999\ 9$ ). The average recovery of ferulic acid was 100.30%, RSD=0.96% ( $n=9$ ). **Conclusion** The method is a simple and accurate assay of good reproducibility. It can be used for the quality control of Xiaozhen Zhiyang capsules.

**[Key words]** Xiaozhen Zhiyang capsules; Ferulic acid; thin layer chromatography; high performance liquid chromatography; quality standard

Supported by the Project of Department of Science and Technology of Inner Mongolia(20010214). Corresponding author: Zhang Yong, Tel: 86-471-6620378, E-mail: zyong69@126.com

消疹止痒胶囊是在我院名老中医传统方的基础上研制而成的纯中药制剂,广泛用于血虚风热所致的各种皮肤疾患,尤其对于急、慢性荨麻疹的疗效甚佳<sup>[1]</sup>。该方由川芎、生地、桑白皮、地骨皮、白鲜皮、麻黄、蝉蜕、诃子8味中药组成,具有养血疏风、清热止痒之功效。为了控制该制剂质量,本研究运用薄层色谱法

(thin layer chromatography, TLC)对诃子、麻黄进行定性鉴别;并用高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC),对胶囊中川芎的主要活性成分阿魏酸进行含量测定。

#### 1 材料与方

##### 1.1 仪器与试剂

LC-10ATvp 泵, SCL-10Avp 型控制器, SPA-10Avp 型检测器, CLASS-VP 色谱工作站。普析通用 TU-1901 型紫外分光光

**[基金项目]** 内蒙古科技厅计划项目(20010214)

**[通信作者]** 张勇,电话:(0471)6620378, E-mail: zyong69@126.com

度仪,硅胶G薄层板自制(10 cm×20 cm)。阿魏酸对照品(含量测定用,中国药品生物制品检定所,批号:0773-9910),没食子酸对照品(薄层鉴别用,中国药品生物制品检定所提供,批号:0831-9501),盐酸麻黄对照品(薄层鉴别用,中国药品生物制品检定所提供,批号:1241-20001),消疹止痒胶囊3批(批号061026、061027、061028,规格0.4 g/粒),甲醇为色谱纯,水为高纯水,其他试剂均为分析纯。硅胶G(薄层色谱用):青岛海洋化工厂。

## 1.2 薄层色谱鉴别

1.2.1 诃子 TLC 鉴别 取本品1 g,加乙醇20 ml,超声处理20 min,滤过,滤液蒸干,残渣加乙醇3 ml使溶解,作为供试品溶液。按处方比例,制备缺诃子样品,并同法制备缺诃子阴性对照溶液。另取没食子酸对照品,加乙醇制成0.5 mg/ml的溶液作为对照品溶液。照薄层色谱法(中国药典附录VI B)实验,吸取上述供试品溶液和缺诃子阴性对照溶液各10 μl、对照品溶液3 μl,分别点于同一硅胶G薄层板上,以氯仿-醋酸乙酯-甲酸(6:4:1)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以2%三氯化铁乙醇溶液,斑点显色清晰。

1.2.2 麻黄 TLC 鉴别 取本品2 g,加浓氨试液1 ml,再加氯仿20 ml,加热回流1 h,滤过,滤液蒸干,残渣加甲醇2 ml使溶解,作为供试品溶液。按处方比例,制备缺麻黄样品,并同法制备缺麻黄阴性对照溶液。另取盐酸麻黄碱对照品,加甲醇制成1 mg/ml的溶液作为对照品溶液。照薄层色谱法(中国药典附录VI B)实验,吸取上述供试品溶液和缺麻黄阴性对照溶液各10 μl、对照品溶液5 μl,分别点于同一硅胶G薄层板上,以三氯甲烷-甲醇-浓氨试液(20:5:0.5)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以茚三酮试液,105℃加热至斑点显色清晰。

## 1.3 阿魏酸的含量测定

1.3.1 色谱条件 色谱柱:色谱柱填充剂为十八烷基硅烷键合硅胶,采用phenomen C<sub>18</sub>柱(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:甲醇-1%冰醋酸(30:70);柱温:35℃;检测波长:316 nm,理论塔板数按阿魏酸峰计不得低于3 000。

1.3.2 对照品溶液的制备 称取阿魏酸对照品适量,精密称定,置棕色量瓶中,加甲醇稀释,定容,得浓度为10 μg/ml对照品溶液。

1.3.3 供试品溶液的制备 取本品0.5 g,研细,精密称定,加0.5%碳酸钠溶液20 ml,超声处理30 min,离心,上清液置分液漏斗中,药渣用0.5%碳酸钠溶液洗涤3次,每次10 ml,离心,洗液并入分液漏斗中,用HCl调节pH值至1~2,用乙醚25、25、20、20、20 ml萃取5次,乙醚液蒸干,用30%甲醇溶液微热使溶解,定量转移至10 ml棕色量瓶中,并用30%甲醇溶液稀释至刻度,离心,取上清液,备用。

1.3.4 阴性对照溶液的制备 按照本品处方组成(缺川芎)并以相同工艺制备空白对照,依照供试品溶液制备法得阴性样品溶液。

1.3.5 专属性考察 精密吸取上述对照品溶液、供试品溶

液、阴性对照溶液各10 μl,分别注入液相色谱仪按上述色谱条件进样分析,记录色谱图。

1.3.6 线性关系考察 精密称取阿魏酸对照品2.5 mg,置50 ml棕色量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,精密吸取1、2、3、4、5、6 ml溶液分别置10 ml量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,得浓度分别为5.38、10.76、16.14、21.52、26.9、32.28 μg/ml的标准溶液系列,各取10 μl进样,按上述色谱条件测定,以峰面积对进样浓度进行回归分析。

1.3.7 精密度实验 取同一份供试品溶液,连续进样6次,测定相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)值。

1.3.8 稳定性实验 取同一份供试品溶液,分别于0、2、4、8、24、32 h进样10 μl,测定阿魏酸峰面积积分值的RSD。

1.3.9 重复性实验 取同一批号(批号061026)供试品6份,精密称定,分别按1.3.3法操作制备供试品溶液,依照1.3.1色谱条件进行重复性试验,测定峰面积,计算每份供试品含量。

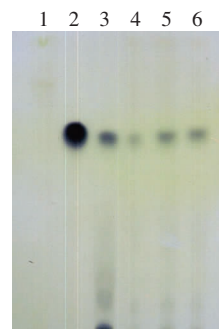
1.3.10 加样回收实验 取供试品(批号061026,含量0.212 mg/g)约0.25 g共9份,精密称定,分别准确加入阿魏酸对照品溶液(阿魏酸浓度为0.023 6 mg/ml)1.6、1.6、1.6、2.0、2.0、2.0、2.4、2.4、2.4 ml,按1.3.3方法平行制备供试品溶液和1.3.1色谱条件,测定每份供试品含量,计算回收率。

1.3.11 样品含量测定 取3批样品(批号061026、061027、061028)。分别按1.3.3方法制得供试品溶液,按1.3.1方法测定,计算样品中阿魏酸的含量。

## 2 结果

### 2.1 薄层色谱鉴别

2.1.1 诃子 TLC 鉴别 结果显示供试品色谱中,在与对照品色谱相应的位置[比移值(R<sub>f</sub>)约为0.67]上,显相同颜色的斑点;阴性对照(缺诃子)在相应的R<sub>f</sub>值处无干扰,表明该方法具较好专属性。见图1。

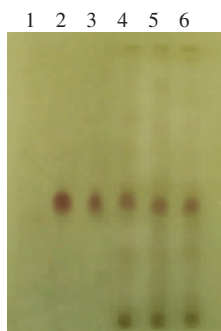


1:阴性对照;2:没食子酸对照品;3:诃子对照药材;4-6:供试品(061026、061027、061028)

图1 诃子的TLC鉴别结果

2.1.2 麻黄 TLC 鉴别 结果显示供试品色谱中,在与对照品色谱相应的位置(R<sub>f</sub>值约为0.43)上,显相同颜色的斑点;且相同工艺、同法制备的阴性对照(缺麻黄)在相应的R<sub>f</sub>值处无

干扰,表明该方法具专属性。见图2。



1: 阴性对照; 2: 盐酸麻黄碱对照品; 3: 麻黄对照药材; 4-6: 供试品 (061026、061027、061028)

图2 麻黄的TLC鉴别结果

## 2.2 含量测定

2.2.1 专属性考察 从色谱图中可见, 阴性对照在与阿魏酸对照品以及供试品相应的峰位处无吸收峰出现, 表明其他组分对阿魏酸的含量测定没有影响, 基线稳定, 此法可行。见图3-5。

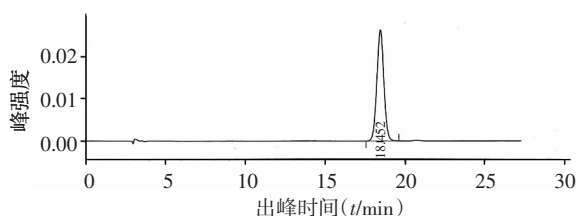


图3 阿魏酸对照品HPLC图谱

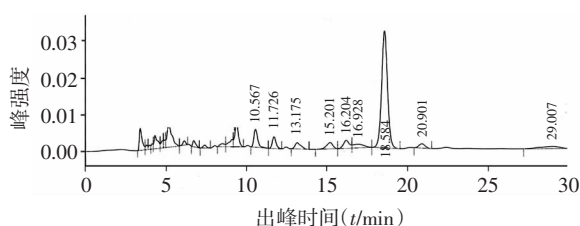


图4 消疹止痒胶囊供试品HPLC图谱

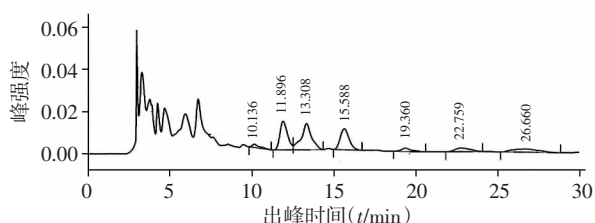


图5 消疹止痒胶囊阴性对照(缺川芎)HPLC图谱

2.2.2 线性关系考察 将阿魏酸对照品标准系列, 依次进样分析, 以峰面积为纵坐标, 以浓度为横坐标, 进行线性回归, 得回归方程  $Y = 7515745.48X - 735.49$ ,  $r = 0.9999$ 。结果表明: 阿魏酸在  $0.0538 \sim 0.3228 \mu\text{g}$  范围内呈良好的线性关系。

2.2.3 精密度 取同一供试品溶液, 连续进样6次, 测得的RSD值为1.13%, 表明仪器精密度良好。

2.2.4 稳定性 取同一供试品溶液在不同时间进样分析, 测得RSD值为1.10%, 结果表明阿魏酸在32h内稳定性良好。

2.2.5 重复性 结果见表1, 表明该方法重现性良好。

表1 阿魏酸含量重复性实验结果

样品号	标示量 (g)	峰面积值 (n=2)	测得含量 (mg/g)	平均含量 (mg/g)	RSD (%)
1	0.5034	810666	0.216		
2	0.5002	785261	0.211		
3	0.4989	778042	0.210	0.212	1.43
4	0.5004	772847	0.208		
5	0.5021	802238	0.215		
6	0.5099	803659	0.212		

2.2.6 加样回收率 从测定数据可见: 加样回收率符合要求。结果见表2。

表2 阿魏酸加样回收实验结果

序号	取样量 (g)	供试品含量 (mg)	加入对照品量 (mg)	测得量 (mg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
1	0.2502	0.0530	0.0378	0.0903	98.57		
2	0.2489	0.0528	0.0378	0.0903	99.29		
3	0.2459	0.0521	0.0378	0.0902	100.71		
4	0.2512	0.0533	0.0472	0.1003	99.67		
5	0.2478	0.0525	0.0472	0.1002	100.99	100.30	0.96
6	0.2496	0.0529	0.0472	0.1005	100.82		
7	0.2599	0.0551	0.0566	0.1117	100.00		
8	0.2501	0.0530	0.0566	0.1103	101.20		
9	0.2499	0.0530	0.0566	0.1104	101.45		

2.2.7 样品含量 将3批样品依次进行含量测定, 计算阿魏酸的含量, 结果见表3。

表3 样品中阿魏酸含量测定结果

批号	平均装量 (g/粒)	取样量	含量 (mg/g)	平均含量 (mg/g)	每粒含量 (mg)
061026	0.4201	0.5012	0.206	0.202	0.0848
		0.5001	0.198		
061027	0.4213	0.5125	0.196	0.196	0.0825
		0.5138	0.196		
061028	0.4239	0.5144	0.178	0.181	0.0767
		0.5215	0.184		

## 3 讨论

急性荨麻疹是皮肤出现风团时隐时现伴有瘙痒反复发作的一种皮肤病, 属于中医风疹块、隐疹等范畴, 为过敏性皮肤疾患。中医学认为皮肤瘙痒是因肌表卫气虚弱, 劳汗当风, 或风寒, 或风热, 或风湿之邪入侵肌肤, 不得疏泄所致, 亦可风、燥、湿、热久留体内化火生燥, 以致津血枯涩, 肌肤失养而致, 故采用凉血润燥, 调和营卫, 清热燥湿法则治疗。随着社会主义现代化进

程的加速,微生物、物理、化学、精神、内分泌失调等致病因素,使本病发病率逐年增加。目前西药多采用祛除病因、抗组胺药、皮质激素、钙剂、拟肾上腺素药等治疗,但疗效并不十分理想,并有一定副作用且易复发<sup>[2-3]</sup>;中医药通过调节整体功能,提高机体自身免疫力往往能够收到显著疗效<sup>[4]</sup>,消疹止痒胶囊临床运用达40余年疗效甚佳,深受广大患者的认可。

消疹止痒胶囊是由8位中药组成的纯中药制剂,中药中所含成分较多,阴性干扰大,参考有关对中成药研究文献报道的方法<sup>[5]</sup>,我们对胶囊中诃子、麻黄两种活性成分做定性鉴别并对川芎中的阿魏酸进行含量测定。参照《中国药典》2005年版诃子、麻黄项下的薄层鉴别方法以及结合有关文献,经反复实验优选了提取溶剂和展开剂,对方中诃子、麻黄进行了薄层色谱鉴别<sup>[6-9]</sup>。结果显示在3批供试品色谱中与其对照品和对照药材相应的位置上斑点明显且清晰,分离效果较理想,阴性对照未见干扰,表明该方法专属性强、简便、快速,用于消疹止痒胶囊的定性鉴别能全面评价产品的质量。

本制剂中川芎为方中主药,其中含有川芎嗪、阿魏酸等成分,川芎嗪易升华,在工艺制备过程中损失较大,成品中转移率较低,测定其含量无实际意义<sup>[10]</sup>,故我们选择阿魏酸为指标性成分,运用高效液相色谱对制剂中川芎的阿魏酸进行含量测定。根据阿魏酸溶于热水、乙醇及乙酸乙酯,易溶于乙醚的性质,我们曾用甲醇直接超声处理制备供试品溶液,但干扰成分太多,色谱分离效果很差,因此本实验结合文献方法,采用碱水提取,酸化后用乙醚萃取的方法可以除去大部分干扰成分,得到较理想的色谱峰,并对碱水洗涤次数、乙醚萃取次数和超声时间进行了考察,将0.5%碳酸钠溶液洗涤次数定为3次;萃取次数定为5次;超声时间选定为30 min。经过多次实验摸索确定了较理想的色谱条件<sup>[11-16]</sup>,结果显示色谱峰分离良好,阴性未见干扰,重复性、精密度、回收率、稳定性等方法学考察结果较理想,且操作简单,专属性强,故该法可作为本制剂的含量测定方法。

从样品含量测定结果可见,阿魏酸的含量最低为0.0767 mg/粒,本实验用相同方法对上述3批样品生产用川芎药材进行了含量测定,测得阿魏酸含量为0.436 mg/g,按理论值折算,成品每粒应含阿魏酸0.209 mg,但实际测得含量结果偏低。阿魏酸遇热、遇光易分解<sup>[17]</sup>,在制剂工艺过程中损失较大,是造成成

品转移率低的原因。所以考虑到不同产地的药材阿魏酸含量有所不同,并结合3批样品的实际含量,暂定本品每粒含阿魏酸( $C_{10}H_{10}O_4$ )不得少于0.07 mg。

综上所述,本研究采用TLC法对其活性成分诃子、麻黄进行定性鉴别;HPLC法对阿魏酸进行定量分析,可为消疹止痒胶囊提供简便可靠、安全的鉴别方法,故可作为该制剂的质量控制标准。

#### 参考文献:

- [1] 李凤林. 临证实践[M]. 呼和浩特: 内蒙古人民出版社, 1980: 106-109.
- [2] 解其伟, 孙焱, 赵桂云, 等. 4种抗组胺药治疗慢性荨麻疹的疗效比较[J]. 中国麻风皮肤病杂志, 2010, 26(3): 195.
- [3] 韦士才. 自拟祛风汤治疗慢性荨麻疹54例[J]. 福建中医药, 2009, 40(1): 40.
- [4] 胡凯. 活血祛风汤治疗慢性荨麻疹疗效观察[J]. 湖北中医学院学报, 2010, 12(1): 58.
- [5] 胡婧, 易凡力, 刘松青. 十五味黑药丸中4种活性成分的定性鉴别及胡椒碱的含量测定[J]. 第三军医大学学报, 2011, 33(6): 621-624.
- [6] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[S]. 北京: 化工工业出版社, 2005: 28, 129, 223, 附录115.
- [7] 马玉花, 洪媛. 薄层色谱法鉴别藏药十味消食散中的五味药材[J]. 华西药学杂志, 2009, 24(4): 426-427.
- [8] 张君, 王颖. 风寒感冒颗粒麻黄薄层色谱鉴别方法研究[J]. 中国民族民间医药杂志, 2011, 20(24): 50-51.
- [9] 李馨, 刘爽, 王金宏, 等. 哮喘片中麻黄的薄层色谱研究[J]. 黑龙江医药, 2009, 22(5): 628-629.
- [10] 丁明玉, 马帅武, 刘德麟. 阿魏酸的稳定性及其在川芎和当归药材中的存在形式[J]. 中草药, 2004, 35(1): 28-30.
- [11] 周琳. 高效液相色谱法测定六味补血颗粒中芍药苷和阿魏酸的含量[J]. 中南药学, 2009, 7(3): 187-190.
- [12] 吕光华, 程世琼, 陈金泉, 等. HPLC测定川芎药材和饮片中游离阿魏酸和总阿魏酸的含量及其质量评价指标[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(2): 194-198.
- [13] 张秀丽. HPLC法测定川芎中阿魏酸的含量[J]. 中国药事, 2009, 23(5): 469-471.
- [14] 冯筠, 唐德才. HPLC法测定肤痒片中阿魏酸含量[J]. 云南中医学院学报, 2007, 30(1): 13-14.
- [15] Zupfer J M, Churchill K E, Rasmusson D C, et al. Variation in Ferulic Acid Concentration among Diverse Barley Cultivars Measured by HPLC and Microspectrophotometry[J]. J Agric Food Chem, 1998, 46(4): 1350-1354.
- [16] Andreasen M F, Christensen L P, Meyer A S, et al. Content of phenolic acids and ferulic acid dehydromers in 17 rye (*Secale cereale* L.) varieties[J]. J Agric Food Chem, 2000, 48(7): 2837-2842.
- [17] 申强, 陈燕忠, 吕竹芬, 等. HPLC法测定祛痹舒肩丸中阿魏酸的含量[J]. 长治医学院学报, 2008, 22(4): 253-255.

(收稿:2012-05-21;修回:2012-07-13)

(编辑 王小寒)