

## 活络止痛凝胶剂的质量标准

刘丽军<sup>1</sup>, 史梦珺<sup>2</sup>, 王李诚<sup>2</sup>, 王金梅<sup>2</sup>, 罗森<sup>1</sup>, 康文艺<sup>2\*</sup>

(1. 河南大学 淮河临床学院, 河南 开封 475004; 2. 河南大学 中药研究所, 河南 开封 475004)

**[摘要]** **目的:**建立活络止痛凝胶剂的质量标准。**方法:**采用薄层色谱法对活络止痛凝胶剂中的肉桂、草乌、延胡索3味中药进行定性鉴别;采用GC-MS对方剂中提取的挥发油部位进行定性鉴别;并采用HPLC测定了活络止痛凝胶剂中桂皮醛、新乌头碱、次乌头碱、乌头碱的含量。**结果:**活络止痛凝胶剂供试品薄层色谱中,与对照药材色谱相应的位置上显相同斑点,且阴性无干扰;GC-MS定性分析表明肉桂醛是挥发油中的主要成分,其次是丁香酚;HPLC测定中,新乌头碱进样量在0.48~2.88 μg与峰面积积分值的线性关系良好( $r=1$ ),次乌头碱进样量在0.16~0.96 μg与峰面积积分值的线性关系良好( $r=1$ ),乌头碱进样量在0.34~2.04 μg与峰面积积分值的线性关系良好( $r=1$ ),桂皮醛进样量在0.268~1.608 μg与峰面积积分值的线性关系良好( $r=0.9991$ )。**结论:**该文所建立的定性定量方法简便,准确,分离度好,适用于活络止痛凝胶剂的质量控制。

**[关键词]** 活络止痛凝胶剂;薄层色谱法;高效液相法;质量标准

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)22-0084-07

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2017220084

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170906.1430.082.html>

**[网络出版时间]** 2017-09-06 14:30

## Quality Standard of Huoluo Zhitong Gel

LIU Li-jun<sup>1</sup>, SHI Meng-jun<sup>2</sup>, WANG Li-cheng<sup>2</sup>, WANG Jin-mei<sup>2</sup>, LUO Miao<sup>1</sup>, KANG Wen-yi<sup>2\*</sup>

(1. Huaihe Medical College, Henan University, Kaifeng 475004, China;

2. Institute of Chinese Materia Medica, Henan University, Kaifeng 475004, China)

**[Abstract]** **Objective:** To establish the quality control standard for Huoluo Zhitong gel. **Method:** Thin layer chromatography (TLC) was used for qualitative identification of Cinnamomi Cortex, Aconiti Kusnezoffii Radix and Corydalis Rhizoma in Huoluo Zhitong gel. Gas Chromatograph- Mass Spectrometer-computer (GC-MS) was used to qualitatively identify the volatile oil in the prescription, and high performance liquid chromatography (HPLC) was used to determine the contents of cinnamaldehyde, mesaconitine, hypaconitine and aconitine. **Result:** The characteristic TLC spots of the testing samples were the same as the spots of the standard samples without any interference from the negative reference substance. Cinnamic aldehyde was the main component in volatile oil, followed by eugenol. Mesaconitine showed a good linear relationship with peak area within the injection amount of 0.48-2.88 μg ( $r=1$ ), hypaconitine within the injection amount of 0.16-0.96 μg ( $r=1$ ), aconitine within the injection amount of 0.34-2.04 μg ( $r=1$ ), and cinnamaldehyde within the injection amount of 0.268-1.608 μg ( $r=0.9991$ ). **Conclusion:** The method has a good separation and it is simple and accurate, which could be used in the quality control of Huoluo Zhitong gel.

**[Key words]** Huoluo Zhitong gel; TLC; HPLC; quality standard

**[收稿日期]** 20170406(028)

**[基金项目]** 2016年地方高校国家级大学生创新创业训练计划项目(201610475027);河南省科技发展计划项目(172102310609);开封市2016年基础与前沿技术研究计划;2016年度河南大学大学生创新创业训练计划项目(16NA018)

**[第一作者]** 刘丽军,主治医师,从事经方治疗疑难杂病临床及科学研究, Tel:0371-23906574, E-mail:liulijun@henu.edu.cn

**[通讯作者]** \*康文艺,教授,博士生导师,从事中药活性成分研究, Tel:0371-23880680, E-mail:kangwenyi@hotmail.com

癌性疼痛多伴随中晚期肿瘤患者,阳气耗散,瘀浊闭阻络脉,不通则痛,笔者临床中根据针对阳虚痰阻络脉的病机,在名医张锡纯的活络效灵丹基础上组建活络止痛方剂。活络止痛方是由草乌、肉桂、延胡索、白芷、当归、海藻、山慈姑、川椒目、丁香等药物组成的外用方。其中草乌味辛、苦,性热,祛风除湿,温经散寒,通络止痛;肉桂性大热,味辛、甘,辛香走窜,温经止痛,二者为君药,共奏温经散寒、活络止痛之功。延胡索性温,味辛苦,活血化瘀、行气止痛,能行血中气滞,气中血滞,治一身上下诸痛为方中臣药。当归补血活血,调经止痛;海藻软坚散结、消痰利水;山慈姑清热解毒、散结止痛,且制约川草乌及肉桂之温燥之性;川椒目辛散温通,利水消肿共为佐使。诸药合用则达到温阳活血、通络止痛的效果。

临床使用中,药材水煎后将滤液浓缩至稍黏稠状后,加入一定量的面粉或蜂蜜使之呈黏稠状,使用时取一定量涂敷于疼痛部位,用布包裹。经长期临床观察,发现活络止痛方剂止痛效果明显,但患者普遍反应贴膏剂黏性差,容易脱落,容易弄脏衣服,且不易清洗。因此,依据临床需求,结合临床疗效,前期对活络止痛方剂进行了剂型改造,制备一批黏附性好,使用方便的凝胶剂。本文旨在通过对活络止痛凝胶剂中草乌、肉桂、延胡索的薄层鉴别,GC-MS 对挥发油成分进行定性研究和对草乌中的新乌头碱、次乌头碱、乌头碱和肉桂中的桂皮醛进行含量测定,以期建立该凝胶剂的质量标准,从而为活络止痛凝胶剂的质量控制和保证临床安全有效提供理论依据<sup>[1]</sup>。

## 1 材料

LC-20AT 型高效液相色谱系统(包括 LC Solution 色谱工作站,日本岛津株式会社),Inertsil ODS SP-C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),lichrospher® 100 RP-18 endcapped 色谱柱(5 μm),AB135-S 型 1/10 万电子天平(瑞士梅特勒-托利多仪器有限公司),SB-2000 型旋转蒸发仪(日本东京理化株式会社),KQ-500DB 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司),ZF 型紫外投射反射分析仪(上海康华生化仪器制造厂),6890-5975 型 GC-MS 联用仪(美国安捷伦科技公司);手动固相微萃取装置(SPME,美国 Supelco 公司),65 μm 聚二甲基硅氧烷萃取头(PDMS-DVB,美国 Supelco 公司)。

对照品新乌头碱(批号 17011302),次乌头碱

(批号 16102002),乌头碱(批号 16041801),桂皮醛(批号 160503)均购自成都普菲德生物技术有限公司;活络止痛凝胶膏剂(批号 20170310,20170311,20170312,河南大学中药研究所自制);草乌对照药材,肉桂对照药材,延胡索对照药材均购自河南省禹州药材市场,经河南大学中药研究所李昌勤教授鉴定分别为毛茛科植物北乌头 *Aconitum kusnezoffii* 的块根,樟科常绿乔木植物肉桂 *Cinnamomum cassia* 的树皮,罂粟科多年生草本植物延胡索 *Corydalis yanhusuo* 的块茎。

甲醇(天津市大茂化学试剂厂,色谱纯),乙腈(美国 Avantor Performance Materials 公司),纯净水(杭州娃哈哈百利食品有限公司),无水乙醇(美国 Avantor Performance Materials 公司),2,4-二硝基苯肼(天津市科密欧化学试剂有限公司),其余试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

### 2.1 薄层定性鉴别

**2.1.1 肉桂** 取本品(批号 20170310,20170311,20170312)各 1 片,除去包膜,剪碎,加入乙醇 40 mL,超声处理 20 min,滤过,收集滤液,置蒸发皿内自然挥发至 10 mL,分别为供试品溶液 1,2,3。取按照 1/10 处方量制备不含肉桂的阴性样品,同上法制成阴性对照溶液。另取肉桂对照药材粉末 0.5 g,加乙醇 10 mL,冷浸 20 min,时时振摇,滤过,作为对照药材溶液<sup>[2]</sup>。照薄层色谱法(《中国药典》2015 年版四部通则 0502)试验,分别吸取 8~10 μL,点于同一硅胶 G 薄层板,以石油醚(60~90℃)-乙酸乙酯(17:3)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以 2,4-二硝基苯肼乙醇试液<sup>[2]</sup>。供试品色谱中,在与对照药材色谱相对应位置上显示相同的斑点,且阴性对照无干扰。

**2.1.2 草乌** 取本品(批号 20170310,20170311,20170312)各 2 片,除去包膜,剪碎,质量约 10 g,加氨试液 5 mL,加乙醚 50 mL,超声处理 30 min,滤过,滤液挥干,残渣加二氯甲烷 1 mL 使溶解,分别为供试品溶液 1,2,3。取按照 1/10 处方量制备不含草乌的阴性样品,同上法制成阴性对照溶液。另取草乌对照药材粉末 2.0 g,加氨试液 2 mL,加乙醚 20 mL,超声处理 30 min,滤过,滤液挥干,残渣加二氯甲烷 1 mL 使溶解,作为对照药材溶液。照薄层色谱法(《中国药典》2015 年版四部通则 0502)试验,上述 3 种溶液各吸取 5 μL,分别点于同一硅胶 G 薄层板,以正己烷-乙酸乙酯-甲醇(6.4:3.6:1)为展开

剂,置氨蒸气饱和 20 min 的展开缸中,展开,取出,晾干,喷以稀碘化铋钾溶液<sup>[2]</sup>。供试品色谱中,在与对照药材色谱相对应位置上显示相同的斑点,且阴性对照品无干扰。

**2.1.3 延胡索** 取本品(批号 20170310, 20170311, 20170312)各 1 片,除去包膜,剪碎,质量约 5 g,加氨试液 5 mL 润湿,加乙醚 50 mL,超声处理 30 min,滤过,滤液蒸干,残渣加甲醇 1 mL 使溶解,分别为供试品溶液 1, 2, 3。取按照 1/10 处方量制备不含延胡索的阴性样品,同上法制成阴性对照溶液另取延胡索对照药材粉末 1 g,加入氨试液 2 mL 润湿,加乙醚 50 mL,超声处理 30 min,滤过,滤液蒸干,残渣加甲醇 1 mL 使溶解,作为对照药材溶液。照薄层色谱法(《中国药典》2015 年版四部通则 0502)试验,上述 3 种溶液各吸取 5  $\mu$ L,分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以正己烷-二氯甲烷-甲醇(6.4:3.6:1)为展开剂,置氨蒸气饱和 20 min 的展开缸中,展开,取出,晾干,置碘蒸气中熏 10 s 后,置紫外光灯(365 nm)下检视<sup>[2]</sup>。供试品色谱中,在与对照药材色谱相对应位置上显示相同的斑点,且阴性对照品无干扰。

## 2.2 挥发油的鉴别分析

**2.2.1 样品的提取** 取肉桂、丁香、川椒目、当归适量,加 5 倍量蒸馏水,水蒸气蒸馏 5 ~ 6 h,待油量不再增加,停止加热,收集挥发油于道夫管中,备用。

**2.2.2 GC-MS 分析条件** GC 色谱条件: DB-5 msJ&W 122-5532 毛细管柱(250  $\mu$ m  $\times$  30.0 m, 0.25  $\mu$ m),载气高纯氦气(99.999%),流速设定 1.0 mL $\cdot$ min<sup>-1</sup>,进样口温度 250  $^{\circ}$ C,程序升温(初始温度 60  $^{\circ}$ C,保持 2.0 min,以 6  $^{\circ}$ C $\cdot$ min<sup>-1</sup>升温至 120  $^{\circ}$ C,保持 2 min,最后以 4  $^{\circ}$ C $\cdot$ min<sup>-1</sup>升温至 230  $^{\circ}$ C,保持 5 min),分流进样,分流比为 10.1:1。

MS 条件:EI 离子源,电离能量 70 eV,离子源温度 230  $^{\circ}$ C,四极杆温度 150  $^{\circ}$ C,传输线温度 280  $^{\circ}$ C,电子倍增器电压 1 612 V,质量扫描范围  $m/z$  30 ~ 1 000,谱图检索采用 Nist08.L 进行检索。

**2.2.3 保留指数测定** 按照文献[3-4]进行 Kovats 保留指数(Kovats index, KI)计算。

**2.2.4 结果** 对活络止痛凝胶剂的挥发油成分进行 GC-MS 分析,使用对照品对比、保留指数和谱库检索等方法对挥发油进行定性分析,结果见表 1,图 1。由表 1 可知,从该制剂的挥发油成分中鉴定出 43 种挥发性成分,占色谱总离子流出峰面积的

85.90%,其主要成分为(*E*)-肉桂醛(28.10%), $\alpha$ -蒎烯(14.43%),丁香酚(13.01%)和乙酸乙烯酯(6.40%),其中肉桂醛为肉桂的主要有效成分,丁香酚是丁香中主要药效成分。

表 1 活络止痛凝胶剂挥发油成分分析

Table 1 Essential oil of Huoluo Zhitong gel

峰号	$t_R$ /min	相对质量 分数/%	化合物	KI
1	2.05	0.02	3-methyl-butana 1 三甲基丁醛	927
2	3.74	0.00	1,3-octadiene 1,3-辛二烯	934
3	3.85	0.00	furfural 糠醛	941
4	4.21	0.00	( <i>E</i> )-2-hexenal ( <i>E</i> )-2-己烯醛	963
5	4.86	0.01	2-heptanone 2-庚酮	1 004
6	4.97	0.16	benzocyclobutene 苯并环丁烯	1 009
7	5.14	0.18	heptanal 庚醛	1 017
8	5.68	0.02	3-thujene 3-崖柏烯	1 043
9	6.28	0.26	camphene 樟烯	1 072
10	6.66	1.05	benzaldehyde 苯甲醛	1 090
11	7.82	0.07	2-carene 2-萜烯	1 142
12	8.03	0.06	2-isopropyltoluene 2-异丙基甲苯	1 152
13	8.35	2.79	1 <i>R</i> - $\alpha$ -pinene 1 <i>R</i> - $\alpha$ -蒎烯	1 166
14	8.56	0.14	ocimene 罗勒烯	1 175
15	8.86	0.09	<i>g</i> -terpinene 萜品烯	1 188
16	9.60	0.15	(+)-4-carene (+)-4-萜烯	1 221
17	10.65	0.19	(4 <i>E</i> ,6 <i>Z</i> )-alloocimene (4 <i>E</i> ,6 <i>Z</i> )- 罗勒烯	1 268
18	12.13	2.78	benzenepropana 1 苯丙酮	1 331
19	13.78	28.10	( <i>E</i> )-cinnamaldehyde ( <i>E</i> )-肉 桂醛	1 399
20	17.65	4.34	3-phenyl-2-propyn-1-ol 3-苯基-2- 丙炔-1-醇	1 529
21	18.56	14.43	copaene $\alpha$ -蒎烯	1 560
22	19.09	13.10	eugenol 丁香酚	1 578
23	20.23	4.38	caryophyllene 石竹烯	1 617
24	20.33	0.26	germacrene D 大牛儿烯 D	1 621
25	20.54	0.18	alloaromadendrene 异亮氨酸	1 629
26	21.07	1.28	$\alpha$ -caryophyllene $\alpha$ -石竹烯	1 647
27	21.49	1.39	$\gamma$ -muurolene $\gamma$ -胡萝卜素	1 662
28	21.94	0.58	$\beta$ -patchoulene $\beta$ -广藜香萜烯	1 678
29	22.15	1.58	$\alpha$ -muurolene $\alpha$ -依兰二烯	1 686
30	22.81	6.40	eugenyl acetate 乙酸乙烯酯	1 709
31	24.43	0.37	spathulenol 斯巴醇	1 770
32	25.05	0.11	11-oxatetracyclo [5.3.2.0(2,7).0 (2,8)] dodecan-9-one 11-氧杂环 [5.3.2.0(2,7).0(2,8)]十二烷-9-酮	1 793

续表 1

峰号	$t_R$ /min	相对质量 分数/%	化合物	KI
33	25.13	0.05	epiglobulol 表布洛尔	1 796
34	25.98	0.07	caryophylladienol I 花生酮	1 828
35	26.44	0.11	$\alpha$ -cadinol $\alpha$ -细辛醚	1 846
36	26.53	0.05	a-selinene 蛇床烯	1 849
37	26.91	0.58	3-butylidenephthalide 3-丁基苯酞	1 863
38	27.20	0.29	2',3',4'-trimethoxyacetophenone 2',3',4'-三甲氧基苯乙酮	1 874
39	29.44	0.06	benzyl benzoate 苯甲酸苄酯	1 963
40	33.44	0.01	hexadecanoic acid, methyl ester 十六烷酸甲酯	2 136
41	34.07	0.01	cis-9-hexadecenoic acid 顺-9-十 六碳烯酸	2 164
42	34.28	0.00	Z-11-hexadecenoic acid Z-11-十 六碳烯酸	2 174
43	34.60	0.18	n-hexadecanoic acid 正十六烷酸	2 188

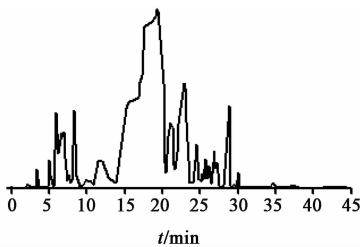


图 1 活络止痛凝胶剂挥发油总离子流  
Fig. 1 Total ion chromatogram of Huoluo Zhitong gel essential oil

### 2.3 总乌头碱测定

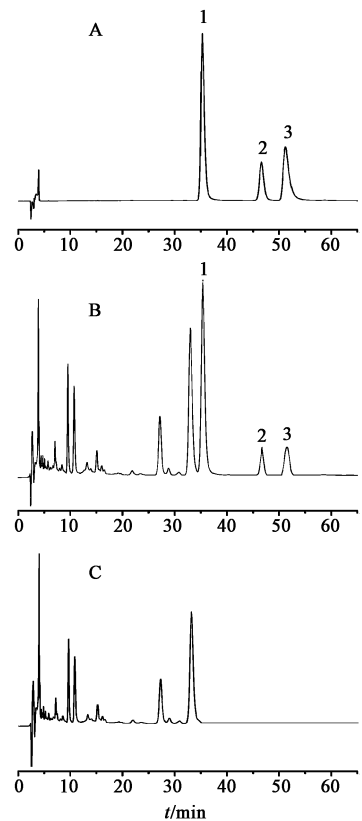
**2.3.1 色谱条件和系统适用性试验** Inertisil ODS-SP C<sub>18</sub> 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相 0.2% 冰乙酸 (加氨水调节 pH 为 6.25)-乙腈 (29:71), 流速 1 mL · min<sup>-1</sup>, 进样量 10 μL, 柱温 30 °C, 检测波长 235 nm。

**2.3.2 对照品溶液的制备** 精密称取新乌头碱对照品 2.4 mg, 次乌头碱 0.8 mg, 乌头碱 1.7 mg, 置于 10 mL 量瓶中, 加 0.01 mol · L<sup>-1</sup> 的盐酸甲醇溶液至刻度, 制成每毫升含新乌头碱对照品 240 μg, 次乌头碱对照品 80 μg, 乌头碱对照品 170 μg 的混合溶液, 即得。

**2.3.3 供试品溶液的制备** 取本品 (批号 20170310, 20170311, 20170312) 各 2 片, 除去包膜, 剪碎混匀, 取约 5 g, 精密称定, 置于具塞锥形瓶中, 加无水乙醇 70 mL, 超声处理 30 min, 滤过, 取药渣再加入无水乙醇 50 mL, 超声处理 30 min, 滤过, 合并 2 次的滤液, 挥干乙醇, 残渣加入 0.6 mol · L<sup>-1</sup> 的

盐酸 10 mL 使溶解, 转移至分液漏斗中, 加入乙醚萃取 3 次 (分别为 20, 10, 10 mL), 弃去乙醚层, 酸水层加氨试液调节 pH 至 9, 加乙醚萃取 3 次 (分别为 10, 10, 10 mL), 合并乙醚液, 蒸干乙醚, 残渣加 0.01 mol · L<sup>-1</sup> 的盐酸甲醇溶液溶解后定容至 10 mL 量瓶中, 摇匀, 用 0.22 μm 的滤膜滤过, 取续滤液即得<sup>[5]</sup>。

**2.3.4 川乌阴性样品溶液的制备与干扰性考察** 取按 1/10 处方量制备不含草乌的阴性样品, 按 2.3.3 项下方法制备, 即得。所得色谱图中阴性样品在对照品出峰位置处未出现色谱峰, 表明阴性样品无干扰, 结果见图 2。



A. 对照品; B. 供试品; C. 川乌阴性样品; 1. 新乌头碱; 2. 次乌头碱; 3. 乌头碱

图 2 活络止痛凝胶剂的 HPLC (总乌头碱)

Fig. 3 HPLC of Huoluo Zhitong gel (total aconitine)

**2.3.5 线性关系考察** 精密吸取乌头总碱混合对照品溶液 2, 4, 6, 8, 10, 12 μL, 按 2.3.1 项下色谱条件分别注入高效液相色谱仪测定。以对照品的进样量 (X, ng) 为横坐标, 峰面积 (Y) 为纵坐标, 得回归方程为新乌头碱  $Y = 1\,233.6X - 14\,963$  ( $r = 1$ ), 次乌头碱  $Y = 1\,054.5X - 6\,267.1$  ( $r = 1$ ), 乌头碱  $Y = 981.09X - 22\,766$  ( $r = 1$ )。结果表明新乌头碱在进样量 0.48 ~ 2.88 μg, 次乌头碱在进样量 0.16 ~

0.96  $\mu\text{g}$ , 乌头碱在进样量 0.34 ~ 2.04  $\mu\text{g}$  均与对应峰面积线性关系良好。

**2.3.6 精密度试验** 取乌头碱混合对照品溶液 10  $\mu\text{L}$ , 按 2.3.1 项下色谱条件重复进样 6 次, 测得峰面积, 结果峰面积 RSD 0.9%, 表明本实验所用仪器的精密度良好。

**2.3.7 稳定性试验** 取供试品溶液 (批号 20170310), 分别在 0, 2, 4, 6, 8, 10 h 进样 10  $\mu\text{L}$ , 测定新乌头碱、次乌头碱、乌头碱峰面积, 结果峰面积 RSD 分别为 1.2%, 1.1%, 1.1%, 表明供试品溶液在 10 h 内稳定。

**2.3.8 重复性试验** 取活络止痛凝胶剂供试品 (批号 20170310) 6 份, 按 2.3.3 项下方法制备, 按 2.3.1 项下色谱条件测定, 得新乌头碱的平均质量

分数为 0.120  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$  (RSD 1.0%), 次乌头碱的平均质量分数为 0.020  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$  (RSD 1.1%), 乌头碱的平均质量为 0.039  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$  (RSD 1.2%), 说明本测定方法重复性良好。

**2.3.9 加样回收率试验** 取活络止痛凝胶剂供试品 (批号 20170310) 2 片, 除去包膜, 剪碎混匀, 取约 5 g (已知新乌头碱质量分数为 0.118  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ , 次乌头碱质量分数为 0.019  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ , 乌头碱质量分数为 0.040  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ), 精密称定质量, 置于具塞锥形瓶中, 平行操作 18 份, 分别精密加入与样品中 3 种成分等量的对照品, 按照 2.3.3 项下方法制备供试品溶液。按 2.3.1 项下色谱条件进样 10  $\mu\text{L}$  测定, 依法计算其加样回收率。结果见表 2。

**2.3.10 含量测定** 分别精密吸取供试品溶液

表 2 活络止痛凝胶剂中 3 种成分的加样回收率试验

Table 2 Results of returning rate of 3 components of Huoluo Zhitong gel

成分	称样量/g	样品中量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均值/%	RSD/%
新乌头碱	5.011 3	0.591 3	0.590 3	1.163 9	97.00	99.34	2.1
	5.008 9	0.591 1	0.590 3	1.168 4	97.80		
	5.007 4	0.590 9	0.590 3	1.177 7	99.41		
	5.002 4	0.590 3	0.590 3	1.170 0	98.20		
	4.993 4	0.589 2	0.590 3	1.193 7	102.41		
次乌头碱	5.002 5	0.590 3	0.590 3	1.187 7	101.20	94.64	1.0
	5.008 9	0.095 2	0.094 3	0.183 6	93.74		
	5.001 9	0.095 0	0.094 3	0.184 0	94.38		
	5.010 3	0.095 2	0.094 3	0.185 0	95.23		
	4.991 7	0.094 8	0.094 3	0.183 6	94.17		
	4.999 7	0.095 0	0.094 3	0.185 7	96.18		
	5.001 6	0.095 0	0.094 3	0.183 8	94.17		
乌头碱	5.003 5	0.200 1	0.198 5	0.402 2	101.81	98.86	1.6
	5.001 6	0.200 1	0.198 5	0.395 0	98.19		
	4.996 7	0.199 9	0.198 5	0.392 8	97.18		
	5.000 8	0.200 0	0.198 5	0.396 5	98.99		
	5.010 1	0.200 4	0.198 5	0.394 5	97.78		
	5.006 9	0.200 3	0.198 5	0.397 2	99.19		

(批号 20170310, 20170311, 20170312) 和对照品溶液各 10  $\mu\text{L}$ , 注入高效液相色谱仪, 得峰面积, 用标准曲线法计算出供试品中新乌头碱的质量分数分别为 0.118, 0.126, 0.158  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$  (RSD 2.1%), 次乌头碱的质量分数分别为 0.019, 0.058, 0.077  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$  (RSD 3.0%), 乌头碱的质量分数分别为 0.040, 0.073, 0.098  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$  (RSD 2.9%)。

**2.4 桂皮醛测定**

**2.4.1 色谱条件和系统适用性试验** Ichrompher®

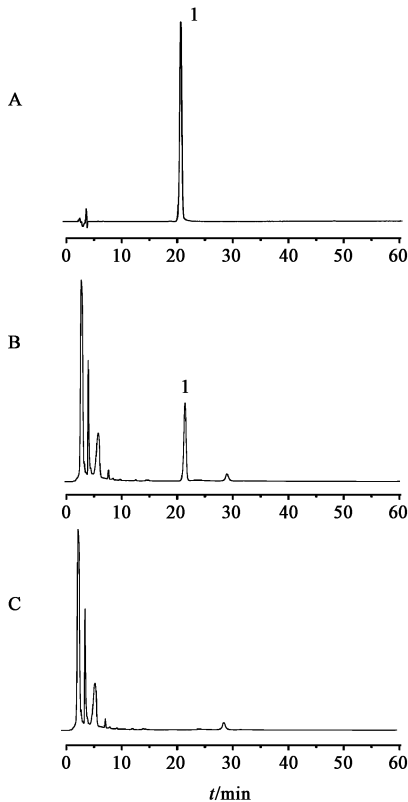
100 RP-18endcapped 色谱柱 (5  $\mu\text{m}$ ), 流动相乙腈-水 (35:65), 流速 0.8  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , 进样量 10  $\mu\text{L}$ , 柱温 30  $^{\circ}\text{C}$ , 检测波长 290 nm。

**2.4.2 对照品溶液的制备** 取桂皮醛对照品 1.34 mg 置 10 mL 量瓶中, 加甲醇使溶解并稀释至刻度, 制得含桂皮醛 0.134  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  的对照品溶液。

**2.4.3 供试品溶液的制备** 取活络止痛凝胶剂 (批号 20170310, 20170311, 20170312) 各 3 片, 置 -10  $^{\circ}\text{C}$  冰箱中冷冻 30 min 取出, 去除外包装, 剥

离药物,将药物混匀,取 10 g,精密称定,置于锥形瓶中,精密加入甲醇 100 mL,再称定质量,超声处理 30 min,并用甲醇补足减失的质量,置 -10 ℃ 冰箱中冷冻 30 min 后取出,摇匀,用 0.22 μm 的滤膜过滤,即得<sup>[6]</sup>。

**2.4.4 肉桂阴性对照品的制备和干扰性考察** 取按 1/10 处方量制备不含肉桂的阴性样品,按 2.4.3 项下方法制备,即得。所得色谱图中阴性样品在相应的出峰位置未出现色谱峰,表明阴性样品无干扰,结果见图 3。



A. 对照品; B. 供试品; C. 肉桂阴性样品; 1. 桂皮醛

图 3 活络止痛凝胶剂的 HPLC (桂皮醛)

Fig. 3 HPLC of Huoluo Zhitong gel (cinnamaldehyde)

**2.4.5 线性关系考察** 精密吸取制得桂皮醛对照品溶液 2, 4, 6, 8, 10, 12 μL, 按上述条件分别注入高效液相色谱仪测定。以对照品的进样量 (X, ng) 为横坐标, 峰面积 (Y) 为纵坐标, 得回归方程为  $Y = 5\,168.4X - 196\,500$  ( $r = 0.999\,1$ )。结果表明桂皮醛进样量在 0.268 ~ 1.608 μg 线性关系良好。

**2.4.6 精密度试验** 精密吸取桂皮醛对照品溶液 10 μL, 按 2.4.1 项下色谱条件重复进样 6 次, 测得峰面积, 结果峰面积 RSD 1.1%, 结果表明本实验所用仪器的精密度良好。

**2.4.7 稳定性试验** 取 2.4.3 项下所得供试品溶

液 (批号 20170310), 分别在 0, 2, 4, 6, 8, 10 h 进样 10 μL, 测定桂皮醛峰面积, 以峰面积计算 RSD 1.2%, 表明供试品溶液在 10 h 内稳定。

**2.4.8 重复性试验** 取活络止痛凝胶剂供试品 (批号 20170310) 6 份, 按供试品溶液的制备方法制备, 按 2.4.1 项下色谱条件测定, 得桂皮醛的平均质量分数为 0.061 mg·g<sup>-1</sup> (RSD 1.2%), 说明本测定方法重复性良好。

**2.4.9 加样回收率试验** 取活络止痛凝胶剂供试品 (批号 20170310) 5 g (已知桂皮醛质量分数为 0.061 mg·g<sup>-1</sup>), 精密称定质量, 置于具塞锥形瓶中, 平行操作 6 份, 分别精密加入与样品中桂皮醛等量的对照品, 按照 2.4.3 项下方法制备供试品溶液。按 2.4.1 项下色谱条件进样 10 μL, 依法计算其加样回收率。结果见表 3。

表 3 活络止痛凝胶剂中桂皮醛加样回收率试验

Table 3 Returning rate of cinnamaldehyde of Huoluo Zhitong gel

称样量 /g	样品中量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
5.016 7	0.301 0	0.591 9	96.39	97.51	2.4
5.014 6	0.300 9	0.597 3	98.21		
5.008 3	0.300 5	0.662 5	94.81		
5.012 9	0.300 8	0.592 4	96.62		
4.985 1	0.299 1	0.606 3	101.79		
5.012 1	0.300 7	0.594 1	98.60		

注: 加入量均为 0.301 8 mg。

**2.4.10 样品测定** 分别精密吸取供试品溶液 (批号 20170310, 20170311, 20170312) 和对照品溶液各 10 μL, 注入高效液相色谱仪, 用标准曲线法测出样品中桂皮醛的质量分数分别为 0.060, 0.073, 0.106 mg·g<sup>-1</sup> (RSD 2.4%)。

### 3 讨论

肉桂、草乌是活络止痛凝胶剂中的君药, 肉桂中主要含有二萜及其糖苷、挥发油、黄烷醇及其多聚体、多酚类、黄酮类等多种类型的化合物, 具有降血糖、抗炎、抗菌、抗肿瘤、镇痛等多种药理作用<sup>[7-11]</sup>。草乌所含的新乌头碱、乌头碱、次乌头碱是其活性成分, 具有抗炎、镇痛、抗肿瘤等多种药理作用<sup>[12-13]</sup>。本实验建立的 TLC 对肉桂、草乌和延胡索进行定性鉴别, 斑点清晰, 分离效果好; GC-MS 对肉桂和丁香中的主要成分桂皮醛和丁香酚的定性鉴别, 简单便捷, 准确率高; HPLC 测定草乌中的乌头总碱以及肉桂中的桂皮醛含量, 重复性、精密度高,

测定结果准确可靠,具有可行性,可作为活络止痛凝胶剂的含量测定方法。预实验中,以桂皮醛提取率为指标,考察了活络止痛凝胶剂提取用溶剂量(2, 5, 10, 20 倍量溶剂),最终确定其最佳提取溶剂用量为 10 倍量。根据本实验结果,按降幅 20% 计为活络止痛凝胶剂的含量限定值<sup>[14]</sup>,则活络止痛凝胶剂中总乌头碱的质量分数不应低于 $0.1416 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ,桂皮醛的质量分数不应低于 $0.048 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 。

[参考文献]

[1] 刘军,王银洁,李文静,等. 三伏贴凝胶膏剂质量标准研究[J]. 云南中医学院学报, 2016, 39(3): 22-25.  
[2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[M]. 北京:中国医药科技出版社, 2015: 137, 139, 236.  
[3] 李锟, 卢引, 顾雪竹, 等. 细叶石仙桃地上部分挥发性成分的 HS-SPME-GC-MS 分析[J]. 中国药房, 2012, 23(35): 3319-3323.  
[4] ZHANG J J, KANG W Y. Volatiles from flowers of *Lagerstroemia caudate* by HS-SPME-GC-MS[J]. Chem Nat Compd, 2014, 50(5): 806-812.  
[5] 李智勇. 中药复方经皮给药制剂-癌痛巴布剂的研制[D]. 广州:广州中医药大学, 2010.  
[6] 王森, 陈爱华, 刘红宁, 等. HPLC 测定狗皮膏中桂皮醛和丁香酚的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 39(3): 73-75.  
[7] Anderson R A, Broadhurst C L, Palansky M M, et al.

Isolation and characterization of polyphenol type-A polymers from cinnamon with insulin-like biological activity[J]. J Agric Food Chem, 2004, 52(1): 65-70.  
[8] Lee H S, Kim B S Kim, M K. Suppression effect of cinnamo-mum cassia bark-derived [J]. J Agr Food Chem, 2002, 50(26): 7700-7703.  
[9] 王永锋, 韦胜利. 灭菌新武器——肉桂[J]. 农业科技通讯, 2001(3): 15.  
[10] LIU L, Hudgins W R, Shack S, et al. Cinnamic acid: a nat-ural product with potential use in cancer intervention[J]. Int J Cancer, 1995, 28(3): 345-350.  
[11] Yu H S, Lee S Y, Jang C G. Involvement of 5-HT 1A and GABAA receptors in the anxiolytic-like effects of cinna-momum cassia in mice[J]. Pharmacol, Biochem Behavior, 2007, 87(1): 164-170.  
[12] 李晓丽, 张少华, 秦林, 等. 川乌与防己配伍镇痛作用的实验研究[J]. 中国中西医结合杂志, 2000, 20(3): 202-204.  
[13] 黄青, 刘启福. 川乌不同炮制品提取物的致突变与抗突变作用研究[J]. 北京中医药大学学报, 2002, 25(2): 41-43.  
[14] 许可. 香莫巴布剂制备工艺及质量标准研究[D]. 武汉:武汉理工大学, 2007.

[责任编辑 顾雪竹]