

HPLC 测定狗皮膏中桂皮醛和丁香酚的含量

王森, 陈爱华, 刘红宁, 朱卫丰*, 李荣苗, 黄招光

(江西中医学院现代中药制剂教育部重点实验室, 南昌 330004)

[摘要] 目的: 建立 HPLC 测定狗皮膏中丁香酚和桂皮醛含量的方法。方法: Phenomenex-Luna C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相乙腈-0.1% 磷酸 (45:55), 流速 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 40 °C, 检测波长 280 nm。结果: 桂皮醛在 0.141 69 ~ 14.169 mg·L⁻¹, 丁香酚在 1.066 04 ~ 106.604 mg·L⁻¹ 质量浓度与峰面积均呈良好的线性关系; 桂皮醛和丁香酚的平均回收率分别为 102.98% (RSD 1.33%), 95.40% (RSD 0.40%)。结论: 该方法简便, 快速, 准确, 重复性好, 可用于狗皮膏中丁香酚和桂皮醛的含量测定。

[关键词] 狗皮膏; 桂皮醛; 丁香酚; 含量测定; 高效液相色谱法

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)15-0073-03

[doi] 10.11653/syfy2013150073

Content Determination of Cinnamaldehyde and Eugenol in Goupi Gao by HPLC

WANG Sen, CHEN Ai-hua, LIU Hong-ning, ZHU Wei-feng*, LI Rong-miao, HUANG Zhao-guang

(Key Laboratory of Modern Preparation of Traditional Chinese Medicine (TCM), Ministry of Education, Jiangxi University of TCM, Nanchang 330004, China)

[Abstract] **Objective:** To establish an HPLC method for the determination of cinnamaldehyde and eugenol in Goupi Gao. **Method:** The HPLC method was performed on a phenomenex-luna C₁₈ (2) (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) at 40 °C and detected at 280 nm. The mobile phase consisted of acetonitrile-0.1% phosphoric acid (45:55) with a flow rate of 1.0 mL·min⁻¹. **Result:** The linear calibration curves were obtained in the concentration range of 0.141 69-14.169 mg·L⁻¹ for cinnamaldehyde and 1.066 04-106.604 mg·L⁻¹ for eugenol. The average recoveries of cinnamaldehyde and eugenol were 102.98% (RSD 1.33%) and 95.40% (RSD 0.40%). **Conclusion:** The method is simple, effective, accurate and reproducible for the determination of cinnamaldehyde and eugenol in Goupi Gao.

[Key words] Gaopi Gao; cinnamaldehyde; eugenol; content; HPLC

狗皮膏是由生川乌、草乌、丁香、肉桂等 29 味中药组成的复方制剂。处方中的川乌、草乌、麻黄、羌活等中药经碎断, 同植物油炸枯去渣, 留下药油炼制滴水成珠, 趁热下丹, 收膏后祛火毒, 再加上丁香、肉桂、乳香、没药等易挥发性药物研成的粉末即得^[1]。狗皮膏可祛风散寒, 活血止痛。用于风寒湿邪、气滞

血瘀引起的四肢麻木, 腰腿疼痛, 筋脉拘挛, 跌打损伤, 闪腰贫气, 脘腹冷痛, 行经腹痛, 湿寒带下, 积聚痞块。《中国药典》^[2] 2010 年版对膏药只有重量差异和软化点的检查, 无其他反应狗皮膏内在质量的检测指标。笔者查询了多方面文献, 发现狗皮膏的研究多停留在改进狗皮膏制备工艺方面和用药安全性上^[3-12], 无关于狗皮膏内在质量的研究。本文首次采用高效液相色谱法测定狗皮膏中有效成分桂皮醛和丁香酚的含量。

1 材料

Agilent 1260 型高效液相色谱仪 (美国安捷伦科技有限公司), Sartorius CP225D 型分析天平 (北京赛多利斯科学仪器有限公司), 医用数控超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司)。

[收稿日期] 20121110(009)

[基金项目] 国家“十一·五”科技支撑计划项目 (2008BA153B071)

[第一作者] 王森, 博士, 讲师, 从事中药外用新剂型与新制剂研究, Tel: 0791-87118614, E-mail: wangsen912912@126.com

[通讯作者] * 朱卫丰, 博士, 教授, 从事中药新药开发与新剂型研究, Tel: 0791-87118614, E-mail: zwf0322@126.com

狗皮膏(批号 20120201, 201200701, 20120903)由江西地康药业有限公司提供,桂皮醛对照品(批号 110710-201016)、丁香酚对照品(批号 110725-201112)购于中国食品药品检定研究院,甲醇(Tedia USA),乙腈(Tedia USA),磷酸(广东光华化学厂有限公司),双蒸水(自制)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Phenomenex-Luna C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈-0.1% 磷酸(45:55),流速 1.0 mL·min⁻¹,检测波长 280 nm,柱温 40 °C,进样量 20 μL。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备 取桂皮醛对照品适量,精密称定,置 25 mL 棕色量瓶中,加甲醇至刻度,得质量浓度为 14.169 2 g·L⁻¹ 桂皮醛对照品母液。取桂皮醛对照品母液 1 mL,置 100 mL 棕色量瓶中,加甲醇至刻度,得 141.692 mg·L⁻¹ 的桂皮醛对照品溶液 A。

取丁香酚对照品,精密称定,置 25 mL 棕色量瓶中,加甲醇至刻度,得质量浓度为 21.320 8 g·L⁻¹ 丁香酚对照品母液。取丁香酚对照品母液 1 mL,置 100 mL 棕色量瓶中,加甲醇至刻度,得质量浓度为 213.208 mg·L⁻¹ 的丁香酚对照品溶液 B。

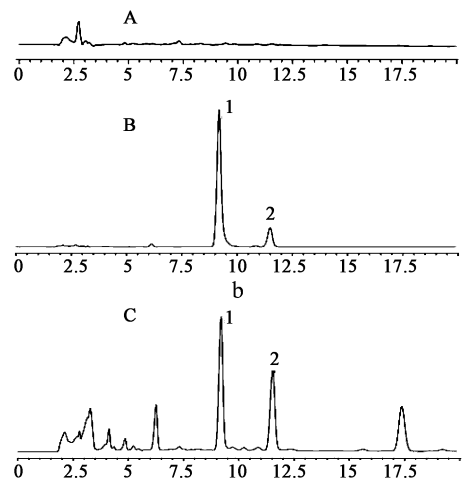
2.2.2 供试品溶液的制备 取狗皮膏 3 贴,置 -10 °C 冰箱中冷冻 30 min 取出,去除外包装,剥离药物,将药物混匀,取 2 g,精密称定,置锥形瓶中,精密加入甲醇溶液 10 mL,称定质量,超声处理 30 min,再称定质量,用甲醇溶液补足减失的质量,置 -10 °C 冰箱中冷冻 30 min,取出,摇匀,用 0.22 μm 的滤膜过滤,即得。

2.2.3 阴性对照液的制备 按处方比例配制不含丁香的阴性样品,按 2.2.2 项下方法制备,即得。

2.3 方法学考察

2.3.1 干扰试验 精密吸取丁香酚对照品、供试品溶液和阴性对照品溶液各 20 μL,依法测定,记录色谱图。结果阴性样品溶液色谱中,在与丁香酚对照品溶液色谱峰相应处未检出色谱峰,表明处方中其他药物对含量测定无干扰,该方法有较好的专属性。见图 1。

2.3.2 线性关系考察 取桂皮醛对照品 A 1 mL,丁香酚对照品 B 5 mL 置 10 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,得桂皮醛质量浓度为 14.169 mg·L⁻¹,丁香酚质量浓度为 106.604 mg·L⁻¹ 混合对照品溶液。取上述混合对照品溶液 0.1, 0.2, 0.5, 1, 1.5, 2 mL,



A. 阴性对照; B. 对照品溶液; C. 供试品溶液; 1. 桂皮醛; 2. 丁香酚

图 1 狗皮膏 HPLC

分别置于 10 mL 的棕色量瓶,加甲醇稀释至刻度,得系列对照品溶液。分别精密吸取各对照品溶液 20 μL,依次注入液相色谱仪,按上述色谱条件测定,以峰面积(Y)为纵坐标,对照品浓度(X)为横坐标,进行线性回归。得回归方程 $Y_{\text{桂皮醛}} = 226.85X + 14.985$ ($r = 0.9999$), $Y_{\text{丁香酚}} = 23.145X + 10.955$ ($r = 0.9999$)。表明桂皮醛在 0.141 69 ~ 14.169 mg·L⁻¹,丁香酚在 1.066 04 ~ 106.604 mg·L⁻¹ 呈良好线性关系。

2.3.3 精密度试验 取线性关系项下系列对照品溶液(桂皮醛 0.708 45 mg·L⁻¹,丁香酚 5.330 2 mg·L⁻¹) 20 μL,在上述色谱条件下连续进样 6 次,计算桂皮醛与丁香酚峰面积的 RSD 分别为 1.20%, 1.27%,均 < 2%,表明仪器精密度良好。

2.3.4 重复性试验 取狗皮膏(批号 20120701) 6 份,按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液,按上述色谱条件测定峰面积并计算样品含量的 RSD,结果桂皮醛和丁香酚含量的 RSD 分别为 1.20%, 1.49% ($n = 6$),表明该方法重复性良好。

2.3.5 稳定性试验 取狗皮膏(批号 20120701) 按 2.2.2 项制备供试品溶液 1 份,于 0, 2, 4, 8, 10, 12, 24 h 分别进样测定峰面积并计算含量,结果桂皮醛的含量 RSD 1.21% ($n = 7$),丁香酚含量的 RSD 1.15% ($n = 7$),表明供试品溶液 24 h 内稳定性良好。

2.3.6 加样回收试验 取已知桂皮醛和丁香酚含量的狗皮膏(批号 20120701)样品 6 份,每份约 1 g,精密称定,分别精确加入混合对照品(桂皮醛 14.169 mg·L⁻¹,丁香酚 106.604 mg·L⁻¹) 250 μL,按上述色谱条

件测定含量,计算回收率,结果桂皮醛与丁香酚平均回收率分别为 102.97% (RSD 1.33%),95.40% (RSD 0.40%) ($n=6$)。结果见表 1。

表 1 狗皮膏中桂皮醛和丁香酚加样回收实验

成分	称样量	已知量	加入量	测得量	回收率	平均回收率	RSD
	/g	/μg	/μg	/μg	/%	/%	/%
桂皮醛	1.016 1	3.787 3	3.542 3	7.694 6	104.98	102.97	1.33
	1.010 8	3.767 6	3.542 3	7.578 7	103.68		
	1.063 9	3.965 5	3.542 3	7.720 4	102.83		
	1.081 2	4.030 0	3.542 3	7.720 4	101.96		
	1.106 2	4.123 1	3.542 3	7.746 1	101.05		
	0.935 7	3.487 6	3.542 3	7.265 5	103.35		
丁香酚	1.016 1	28.169 4	26.651	52.500 2	95.77	95.40	0.4
	1.010 8	28.022 5	26.651	51.951 5	95.02		
	1.063 9	29.494 6	26.651	53.892 8	95.99		
	1.081 2	29.974 2	26.651	53.935 0	95.25		
	1.106 2	30.667 3	26.651	54.568 0	95.2		
	0.935 7	25.940 5	26.651	50.052 4	95.17		

2.4 样品测定 取批号为 20120201, 20120701, 20120903 的狗皮膏 3 贴,去除外包装,剥离药物,将药物混匀,取 2 g,精密称定,置锥形瓶中,按 2.2.2 项下制备供试品,按上述色谱条件测定样品,以外标法计算桂皮醛和丁香酚的含量。结果见表 2。

表 2 狗皮膏中桂皮醛和丁香酚的含量测定

批号	桂皮醛	RSD	丁香酚	RSD
	/μg·g ⁻¹	/%	/μg·g ⁻¹	/%
20120201	7.81	1.49	1.21	0.12
20120701	8.13	0.17	1.16	0.24
20120903	8.86	0.15	1.07	0.67

3 讨论

膏药是传统医学中的一个重要组成部分,是五大药物剂型——丸、散、丹、膏、汤之一。1963 年版药典,膏药(外贴膏)与外敷膏及内服膏统称膏剂,合并收录。随着科技的发展和检测技术的提高,膏药的质量标准在不断完善,《中国药典》2010 年版对膏药膏体外观、贮藏条件及检查项目等进行了相应描述和规定,但具体的控制项目只有重量差异和软化点,未有反应膏药内在质量的指标,膏药质量标准亟待提升。

笔者查阅了国内大量相关文献,膏药的研究多停留在制备工艺的改进上,对膏药质量的研究较少见,经分析可能与下列因素有关:①膏药的处方复杂,多为几十味中药组成。从单味中药来看,许多成分未检测出来;几十味中药组成的复方更是复杂,而且不同中药的成分相互作用,产生新的物质,故难以选择代表性的成分进行研究。②膏药制剂工艺特

殊。膏药在制剂过程中,大部分药味经过高温油炸,其成分多被破坏;膏药基质特殊,有植物油与铅丹高温形成的铅皂,还含有多余的铅丹和植物油,黏性大、吸附性强、难以清洗,分析时样品的处理比较麻烦。种种原因,使膏药的研究分析较少,质量标准不完善。

笔者选用黑膏药中代表品种狗皮膏,进行质量标准研究。采用高效液相色谱法测定狗皮膏中主药肉桂、丁香的有效成分桂皮醛和丁香酚的含量,以期提高狗皮膏质量标准,促使膏药生产标准化、质量控制客观规范化,实现膏药的现代化,使这个千年古老的剂型不断发扬光大。从实验结果可看出,这 3 批狗皮膏中,桂皮醛的含量在 7.87 ~ 8.86 μg·g⁻¹,丁香酚含量在 1.07 ~ 1.20 μg·g⁻¹,鉴于样品批次不够,需要累积样品进一步进行试验,确定狗皮膏中有效成分桂皮醛和丁香酚的含量限度。

【参考文献】

- [1] 李曼,党璇,巩江,等. 狗皮膏药研究概况[J]. 辽宁中医药大学学报,2012,14(1):93.
- [2] 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,2010:附录 11.
- [3] 熊登科,吴保民,黄志军,等. HPLC 法测定儿泻贴中丁香酚的含量[J]. 中国药师,2011,14(12):1738.
- [4] 吴运莉,舒阳,孟小夏,等. HPLC 法测定香青百草油中丁香酚的含量[J]. 贵阳医学院学报,2011,36(5):488.
- [5] 吴军侠,赵红侠. 高效液相色谱法测定蒙药暖宫七味散中丁香酚含量[J]. 中国药业,2010,19(5):31.
- [6] 隋忠国,毕晓林,荆凡波. 温通巴布膏制备工艺与含量测定的实验研究[J]. 山东医药,2007,47(19):84.
- [7] 刘光斌,毛和平,姜芳宁,等. HPLC 同时测定和胃散中橙皮苷和桂皮醛的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(4):87.
- [8] 曾惠芳,曾宝,黄耀海,等. HPLC 法测定参香养胃胶囊中橙皮苷、丁香酚和厚朴酚的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2006,12(1):12.
- [9] 常星洁,刘志辉,严冬,等. HPLC 法测定乳安凝胶膏剂中 4 种化学成分的含量[J]. 中国药事,2012,26(1):25.
- [10] 高小春,韩建伟. 均匀设计法优选狗皮膏贴基质配方研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(4):12.
- [11] 李帆帆,孟宪丽,赵贵琴,等. 狗皮膏大鼠长期毒性试验的体内血液铅变化研究[J]. 中国中药杂志,2012,37(6):728.
- [12] 曾勇,李帆帆,李纯钢,等. 长期外用狗皮膏对大鼠肾功能及铅蓄积的影响[J]. 中国中药杂志,2012,37(6):731.

[责任编辑 顾雪竹]