

气相色谱法同时测定通络祛痛膏中挥发性成分含量

尹文静¹, 张春霞², 严家飞²

(1. 上海交通大学医学院附属仁济医院, 上海 200127; 2. 河南羚锐制药股份有限公司, 河南信阳 465550)

摘要: **目的** 建立 GC 法同步测定通络祛痛膏中樟脑、薄荷脑、龙脑等 3 种成分含量。**方法** 使用气相色谱仪(岛津 GC-2014), DB-WAX 毛细管柱(30 m×0.25 mm×0.50 μm)。以氮气为载气, FID 检测器, 柱温 140 ℃, 内标法测定样品中 3 种成分的含量。**结果** 通络祛痛膏中樟脑、薄荷脑和龙脑及内标物萘等 4 种物质在同一色谱条件下获得良好分离; 樟脑、薄荷脑、龙脑的回收率分别为 98.76%(RSD=0.60%), 97.48%(RSD=0.66%), 100.99%(RSD=0.65%)。采用此法对 10 批样品进行含量测定, 均取得了满意的结果。**结论** 该方法简便、准确, 分离度好, 可用于控制通络祛痛膏的质量。

关键词: 通络祛痛膏; 气相色谱; 樟脑; 薄荷脑; 龙脑

中图分类号: R284.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-2723(2013)06-0026-04

通络祛痛膏由樟脑、薄荷脑、冰片、当归、川芎、红花和大黄等 14 味药组成的一种外用橡胶膏剂, 具有活血通络, 散寒除湿, 消肿止痛等作用; 用于腰部、膝部骨性关节炎血停滞、寒湿阻络证, 症见关节刺痛或钝痛, 关节僵硬, 屈伸不利, 畏寒肢冷。用于颈椎病(神经根型)瘀血停滞、寒湿阻络证, 症见颈项疼痛、肩臂疼痛、颈项活动不利、肢体麻木、畏寒肢冷、肢体困重等^[1], 现收载于国家食品药品监督管理局标(YBZ10332008)现行标准中, 仅有阿魏酸的 HPLC 含量测定项及樟脑的含量测定项, 采用了毛细管气相色谱内标法^[2-7], 1 次进样可同时测定本品中樟脑、薄荷脑、和龙脑等组分的含量, 结果理想, 可以作为通络祛痛膏的质量控制方法。

1 仪器与试药

岛津 GC-2014 气相色谱仪, FID 检测器。METTLER AG135 型电子天平(瑞士 Precisa)。对照品樟脑(批号 110747-201008)、薄荷脑(批号 110728-200506); 龙脑(批号 110881-200706), 以上

对照品均由中国食品药品检定研究院提供, 其他所用试剂均为分析纯。样品由河南羚锐制药股份有限公司(批号: 090628、090629、090630、100703、100704、100705、110602、110603、110604、110614)提供。

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 内标溶液的制备

精密称取萘 245.88 mg, 置于 25 mL 量瓶中, 用乙酸乙酯稀释至刻度, 摇匀, 作为内标溶液。

2.1.2 混合对照品溶液的制备

精密称取樟脑 30.50 mg、薄荷脑 15.00 mg、龙脑 8.10 mg, 置于同一 10 mL 量瓶中, 精密加入内标溶液 1 mL, 用乙酸乙酯稀释至刻度, 摇匀, 作为混合对照品溶液, 进样测定, 分离度、塔板数和拖尾因子均符合规定(表 1)。

2.1.3 供试品溶液的制备

取本品 3 贴, 剪成窄条状, 除去盖衬, 置于 250 mL 烧瓶中, 加水 100 mL, 照挥发油测定法甲法

表 1 对照品、内标物质系统适用性试验结果

名称	来源	批号	保留时间/min	分离度	塔板数	拖尾因子
樟脑	中国药品生物制品检定所	110747-201008	4.0	-	26854	0.832
薄荷脑	中国药品生物制品检定所	110728-200506	5.2	11.8	33225	0.885
龙脑	中国药品生物制品检定所	110881-200706	6.6	10.7	33113	0.911
萘	上海远航化工厂	20080625	7.9	8.0	39660	0.925

收稿日期: 2013-11-29 修回日期: 2013-12-06

作者简介: 尹文静(1977~), 女, 河南商城人, 主管药师, 主要从事临床药学工作。

(《中国药典》2010 年版一部附录 XD),自测定器上端加水至充满刻度部分,并溢流入烧瓶时为止,再加乙酸乙酯 2mL,加热回流提取 3h,放冷,分取乙酸乙酯液,置铺有无水硫酸钠的滤纸脱水,滤液置预先精密加入 5mL 内标溶液的 50mL 量瓶中,以适量的乙酸乙酯分次洗涤冷凝管,挥发油测定器及滤器,洗涤液并入同一量瓶中,并加乙酸乙酯稀释至刻度,摇匀,即得供试品溶液。

2.2 色谱条件与系统使用性试验

2.2.1 色谱柱

Agilent DB-WAX(0.32mm×30m,0.5μm)。载气:高纯氮气,流速 2 mL·min⁻¹,分流比为 25:1;氢气流速 35 mL·min⁻¹,空气流速 400 mL·min⁻¹;柱温:140℃,检测器 250℃,进样口 220℃;进样量 1μL。

2.2.2 干扰试验

按处方比例(除樟脑、薄荷脑和冰片外)配置空白基质,按“2.1.3”项下方法,制备空白溶液。吸取空白溶液、对照品溶液及供试品溶液进样测定。结果样品基质对主药测定无干扰,(见图 1、图 2、和图 3)

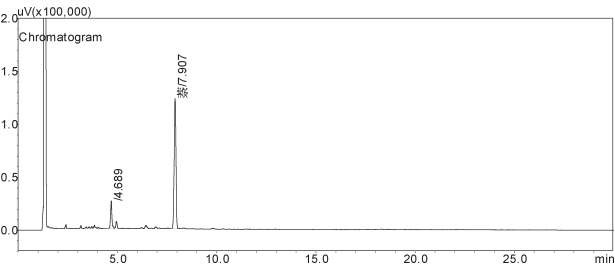


图 1 通络祛痛膏阴性样品 GC 色谱图

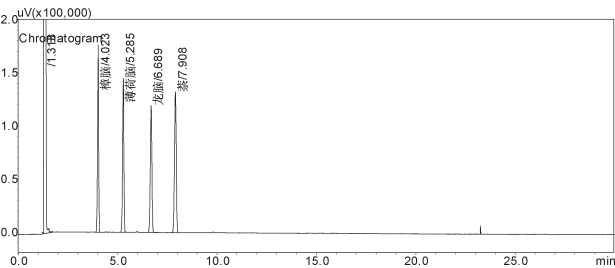


图 2 樟脑、薄荷脑与龙脑对照品 GC 色谱图

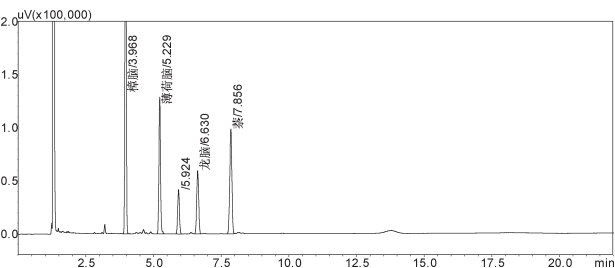


图 3 通络祛痛膏样品 GC 色谱图

2.3 线性关系考察

精密称取樟脑 113.19mg、薄荷脑 51.46mg、龙脑 30.18mg,置 10mL 量瓶中,用乙酸乙酯溶解稀释至刻度,摇匀,分别量取 0.10、0.25、0.50、1.0、2.0、3.0mL 的混合对照品溶液,置已加入 1mL 内标溶液(5.30mg/mL)的 5mL 量瓶中,用乙酸乙酯稀释至刻度。每一级别浓度连续进样 3 次,分别测得峰面积。以对照品量为横坐标,以各对照品与内标物的峰面积比为纵坐标,进行回归,樟脑、薄荷脑和龙脑的回归方程分别为:

樟脑 $y=0.7763x+0.018, r=0.9999$;
薄荷脑 $y=0.805x+0.0087, r=0.9999$;
龙脑 $y=0.8047x+0.0049, r=0.9999$ 。

上述结果表明樟脑在 0.224~6.725μg、薄荷脑在 0.103~3.088μg、龙脑在 0.060~1.811μg 范围内线性关系良好(见表 2、表 3 和表 4)。

表 2 樟脑线性关系(n=3)

编号	对照品峰面积	内标物峰面积	对照品峰面积/ 内标物峰面积	对照品量 /μg
1	142082	796728	0.178	0.224
2	354893	798950	0.444	0.560
3	695189	799461	0.870	1.121
4	1452865	798871	1.819	2.242
5	2824436	809714	3.488	4.484
6	4196325	802631	5.230	6.725

表 3 薄荷脑线性关系(n=3)

编号	对照品峰面积	内标物峰面积	对照品峰面积/ 内标物峰面积	对照品量 /μg
1	66905	796728	0.084	0.103
2	168829	798950	0.211	0.257
3	332007	799461	0.415	0.515
4	691599	798871	0.866	1.029
5	1345167	809714	1.661	2.058
6	1998238	802631	2.490	3.088

表 4 龙脑线性关系(n=3)

编号	对照品峰面积	内标物峰面积	对照品峰面积/ 内标物峰面积	对照品量 /μg
1	39764	796728	0.050	0.060
2	99422	798950	0.124	0.151
3	194277	799461	0.243	0.302
4	404988	798871	0.507	0.604
5	787980	809714	0.973	1.207
6	1171702	802631	1.460	1.811

2.4 精密度试验

精密吸取同一供试品(河南羚锐制药股份有限公司 100703 批)溶液 1 μ L,重复进样 6 次,分别以樟脑峰面积、薄荷脑峰面积、龙脑峰面积与内标物峰面积之比值计算 RSD,分别为 1.85%、3.17%、2.38%,表明仪器精密度良好。结果见表 5。

2.5 稳定性试验

精密吸取同一供试品(河南羚锐制药股份有限公司 090628 批)溶液 1 μ L,分别在 0,2,4,6,8,12,24h 依法测定,分别以樟脑峰面积、薄荷脑峰面积、龙脑峰面积与内标物峰面积之比值计算 RSD,分别为 0.19%、0.53%、0.72%,结果见表 6。

表 5 精密度试验

编号	樟脑峰面积	薄荷脑峰面积	龙脑峰面积	萘峰面积	樟脑峰面积/ 萘峰面积	薄荷脑峰面积/ 萘峰面积	龙脑峰面积/ 萘峰面积
1	1178449	639253	377522	701017	1.681	0.912	0.539
2	1227467	665061	392258	755374	1.692	0.880	0.519
3	1188043	647390	381470	708053	1.678	0.914	0.539
4	1196365	654793	373954	726868	1.669	0.901	0.514
5	1201780	681843	385523	719042	1.671	0.948	0.536
6	1225845	637899	376961	721893	1.698	0.884	0.522
RSD/%					1.85	3.17	2.38

表 6 稳定性试验

编号	樟脑峰面积	薄荷脑峰面积	龙脑峰面积	萘峰面积	樟脑峰面积/ 萘峰面积	薄荷脑峰面积/ 萘峰面积	龙脑峰面积/ 萘峰面积
0	1183670	642235	381200	703832	1.682	0.912	0.542
2	1178439	639348	378034	704326	1.673	0.908	0.537
4	1190237	649704	381455	708407	1.680	0.917	0.538
6	1190921	648909	386342	708309	1.681	0.916	0.545
8	1175932	642860	376695	698959	1.682	0.920	0.539
12	1210383	659635	389035	720441	1.680	0.916	0.540
24	1186454	651101	386237	705521	1.682	0.923	0.547
RSD/%					0.19	0.53	0.72

2.6 重复性试验

取本品(河南羚锐制药股份有限公司 110603 批)6 份,按照供试品溶液制备方法制备供试品,每份供试品平行进样 2 次,并测定,计算每贴含量及其 RSD,结果见表 7。

表 7 重复性试验

编号	樟脑含量/ (mg/贴)	薄荷脑含量/ (mg/贴)	龙脑含量/ (mg/贴)
1	47.044	21.113	13.065
2	46.998	21.094	13.083
3	47.198	21.225	13.092
4	47.154	21.261	13.093
5	48.318	21.877	13.419
6	47.261	21.140	13.108
含量均值	47.329	21.285	13.143
RSD/%	1.04	1.40	1.03

2.7 回收率试验

取已知含量(河南羚锐制药股份有限公司 100705 批)样品 6 份(1.5 贴),每份加入对照品适量,照供试品溶液制备方法制备供试品,每份供试品平行进样 2 次,并测定,计算回收率及其 RSD,结果见表 8。

2.8 样品测定

按“2.1.3”项下方法制备 10 批供试液,测定每贴含量,结果见表 9。

3 讨论

在供试品溶液的制备时,曾对提取时间进行考察,分别加热回流 1,2,3,4,5 h 进行提取,结果回流提取 3h 以后,含量不再增加,并略有下降,因此供试品溶液制备的提取时间定为 3h。另外,考察了样品提取时用甲苯及乙酸乙酯对照试验,结果含量没

表 8 加样回收试验

组分	已知量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均回收 率/%	RSD /%
樟 脑	70.99	65.01	135.89	99.82	98.76	0.60
		65.62	135.82	98.78		
		65.46	135.54	98.61		
		65.52	135.73	98.82		
		65.24	134.97	98.06		
		65.14	135.13	98.46		
薄 荷 脑	31.93	30.16	61.35	97.57	97.48	0.66
		30.01	61.32	97.94		
		30.05	61.35	97.91		
		30.01	61.28	97.82		
		29.89	61.05	97.42		
		29.93	60.73	96.23		
龙 脑	19.72	18.06	38.07	101.63	100.99	0.65
		18.22	38.19	101.39		
		18.39	38.08	99.90		
		18.23	38.12	101.01		
		18.01	37.83	100.57		
		18.05	38.03	101.47		

表 9 通络祛痛膏含量测定样品测定结果

批号	樟脑含量/ (mg/贴)	薄荷脑含量/ (mg/贴)	龙脑含量/ (mg/贴)
090628	43.597	19.813	12.076
090629	43.779	19.859	12.253
090630	42.894	19.241	11.761
100703	45.425	20.258	12.662
100704	43.222	19.741	11.966
100405	49.653	22.108	13.550
110602	46.849	20.676	12.861
110603	46.148	20.518	12.648
110604	44.927	19.586	12.554
110614	43.223	19.920	12.056

有区别,考虑到甲苯的毒性,所以用乙酸乙酯做溶剂。考虑通络祛痛膏中冰片是由龙脑和异龙脑组成,如直接选冰片做对照品,含量结果会不够科学和准确,所以参照《中国药典》2010 年版一部冰片含量测定方法,选用龙脑作为对照品来控制冰片的含量。另考察了 3 支不同商品规格的色谱柱(Agilent HP-5 毛细管色谱柱,FFAP 毛细管色谱柱,DB-WAX 毛细管色谱柱),结果只有 DB-WAX 毛细管色谱柱能使樟脑、薄荷脑、龙脑及内标物萘在短时间(10min)内完全分离(峰分离度均大于 1.5);理论板数均不小于 5 000,符合药典要求,因此以 DB-WAX 毛细管色谱柱作为本品试验用色谱柱。

综上所述,本研究所建立含量测定的方法,简单易行、方法可靠、重复性好,为通络祛痛膏的质量控制提供了依据。

参考文献

- [1] 郭立,江开勇,邵庆芳,等.通络祛痛膏药材挥发油提取工艺研究[J]. 河南大学学报(医学版),2008,27(3):38-40.
- [2] 刘杰,董文玲. 4 种中药橡胶剂中樟脑薄荷脑冰片和水杨酸甲酯含量的气相色谱法测定 [J]. 中成药,2004,26(10):795-798.
- [3] 孙晓梅,代东梅,常雪灵,等.GC 法同时测定麝香壮骨膏中樟脑、薄荷脑、冰片和水杨酸甲酯的含量[J]. 中成药,2007,29(7):1004-1008.
- [4] 刘美龙,严光辉. 气相色谱法同时测定祛伤消肿酊中樟脑、薄荷脑、龙脑的含量[J]. 海峡药学,2011,23(12):65-67.
- [5] 朱静,贾晓斌,郑智音,等. 气相色谱法测定透骨灵橡胶膏中樟脑、冰片和薄荷脑的含量[J]. 中国医院药学杂志,2012,32(11):831-833.
- [6] 王伟炳,朱华军. 气相色谱法测定风痛灵中薄荷脑、冰片和樟脑的含量 [J]. 中国中药杂志,2007,32(21):2319-2320.
- [7] 陈斌,贾晓斌,刘齐. 气相色谱法测定不同关节止痛膏中樟脑、薄荷脑和水杨酸甲酯的含量[J]. 中药材,2010,33(8):1340-1343.

(编辑:李平)

(英文摘要见第 33 页)

- [13] Kulkarni A. Massage and touch therapy in neonates; the current evidence[J]. Indian Pediatr, 2010, 47(9): 771-776.
- [14] Field T, Diego M, Hernandez-Reif M. Preterm infant massage therapy research: A review [J]. Infant Behav Dev, 2010, 33(2): 115-124.
- [15] Ironson G, Field T, Scafidi F, et al. Massage therapy is associated with enhancement of the immune system's cytotoxic capacity[J]. Int J Neurosci, 1996, 84: 205-217.
- [16] Ang JY, Lua JL, Mathur A, et al. A randomized placebo-controlled trial of massage therapy on the immune system of preterm infants [J]. Pediatrics, 2012, 130 (6): e1549-e1558.
- [17] Lee YH, Park BN, Kim SH, et al. The effects of heat and massage application on autonomic nervous system [J]. Yonsei Med J, 2011, 52(6): 982-989.
- [18] Buckle J, Newberg A, Wintering N, et al. Measurement of regional cerebral blood flow associated with the M technique-light massage therapy: a case series and longitudinal study using SPECT[J]. J Altern Complement Med, 2008, 14 (8): 903-910.
- [19] 郭东鸣. 推拿按摩影响内分泌功能的研究进展 [J]. 中医药导报, 2011, 17(9): 85-87.

(编辑: 李平)

Effects of Spinal Massage on the Growth Development of Neonatal Rats with Hypoxic-ischemic Brain Injury

DING Jian-wei¹, TAI Xian-tao¹, JIA Jie², CAO Shuang³, LI Bing⁴, XIONG Lei¹

(1. School of Acupuncture, Massage and Rehabilitation, Yunnan University of Traditional Chinese Medicine, Kunming

Yunnan 650500; 2. Department of Rehabilitation, Huashan Hospital, Fudan University, Shanghai 200040;

3. Shanghai Ninth People's Hospital Affiliated Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200011;

4. Central Laboratory, Jinshan Hospital, Fudan University, Shanghai 201508)

ABSTRACT: **Objective** To observe whether massage can promote growth and development of pups with hypoxic-ischemic encephalopathy (HIE) in order to seek effective means of intervention of HIE. **Methods** The newborn SD rats were randomly divided into control group ($n=12$), model group ($n=13$) and the massage group ($n=12$). HIE model with the pups after birth for three days (3-day-postnatal, P3) was prepared using total unilateral carotid artery ligation combined hypoxia. The pups in the massage group undergone spinal massage intervention. The levels of weight and the time of opening eyes and ears open of all newborn rats were evaluated, respectively. The gait and negative chemotaxis experiments were done at the same time. **Results** Compared with the control group, the levels of weight of newborn rats in the model group were significantly increased ($P<0.01$, $P<0.05$), whereas this phenomenon was reversed by spinal massage ($P<0.01$, $P<0.05$). The time of opening eyes, ears open and turning around and reach the upper rim end of the board of newborn rats in the model group were significantly longer than the control group ($P<0.01$, $P<0.05$), which was reversed by massage ($P<0.01$, $P<0.05$). **Conclusion** Spinal massage can promote growth and development of pups with hypoxic-ischemic encephalopathy, it may be one of the effective means of intervention in hypoxic ischemic encephalopathy.

KEY WORDS: hypoxic ischemic encephalopathy; spinal massage; growth; development

(原文见第 26 页)

Simultaneous Detection for Different Composition of Volatile Oil in Tongluo Qutong Gao by Gas Chromatography

YIN Wen-jing¹, ZHANG Chun-xia², YAN Jia-fei²

(1. Renji Hospital, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 200127, China;

2. Henan Lingrui Pharmaceutical Co. Ltd, Xinyang Henan 465550, China)

ABSTRACT: **Objective** To establish a method for simultaneous determination of camphor, menthol crystal and camphor in Tongluo Qutong Gao. **Methods** Naphthalene was used as the internal standard. DB-WAX capillary column was adopted, nitrogen as the carrier gas, and FID as the detector. The column temperature at 140°C. **Results** Camphor, menthol crystal and camphor in Tongluo Qutong Gao and naphthalene have been separated well. The average recovery rates of camphor, menthol crystal and camphor were 98.76% (RSD=0.66%), 97.48% (RSD=0.66%) and 100.99% (RSD=1.4%), respectively. **Conclusion** The method is simple, accurate and separable, and it can also be used to control the quality of Tongluo Qutong Gao.

KEY WORDS: gas chromatography; volatile oil(camphor, menthol crystal and camphor); tongluo qutong gao