

# 狗皮膏的气相色谱指纹图谱研究

黄惠琼\*, 黄 澜, 李玲玲(厦门市药品检验所, 福建 厦门 361012)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)09-1264-03  
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.09.35

**摘要** 目的:建立狗皮膏的气相色谱指纹图谱。方法:采用气相色谱法。色谱柱为弹性石英毛细管柱,程序升温,进样口温度为220℃,检测器为氢火焰离子化检测器,温度为250℃,分流进样量为1μl,分流比为20:1。以丁香酚色谱峰为参照峰,分析5家生产企业32批狗皮膏,采用中药指纹图谱相似度计算软件(2009版)进行共有峰鉴定和相似度评价,并对32批样品的特征图谱进行聚类分析。结果:32批狗皮膏共有11个峰,5家生产企业32批样品间特征图谱相似度低,可聚为5类。结论:所建立的特征图谱专属性强,结果稳定,可为狗皮膏的质量评估和控制提供依据。

**关键词** 狗皮膏;气相色谱法;特征图谱;聚类分析

## Study on GC Specific Chromatogram of Goupi Cream

HUANG Huiqiong, HUANG Lan, LI Lingling (Xiamen Institute for Drug Control, Fujian Xiamen 361012, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To establish the GC specific chromatogram of Goupi cream. METHODS: Gas chromatography was performed on the column of fused silica capillary column by programmed temperature, injection temperature was 220℃, detector was hydrogen flame ionization detector with temperature of 250℃, the injection volume was 1 μl and split ratio of 20:1. The eugenol chromatographic peak was used as reference peak to determine the 32 batches of Goupi cream from 5 enterprises, TCM fingerprint similarity calculation software (2009 edition) was conducted for the common peaks identification and similarity evaluation, and the specific chromatogram cluster analysis of 32 batches of samples. RESULTS: There were totally 11 common peaks in the 32 batches of Goupi cream, the 32 batches of samples from different enterprises showed low similarity and could be clustered into 5 types. CONCLUSIONS: The established specific chromatogram is specific and stable, and can provide reference for the quality evaluation and control of Goupi cream.

**KEYWORDS** Goupi cream; Gas chromatography; Specific chromatogram; Cluster analysis

狗皮膏为传统黑膏药制剂,由生川乌、生草乌、羌活、独活、青风藤、香加皮、防风、铁丝威灵仙、苍术、蛇床子、麻黄、高良姜、小茴香、官桂、当归、赤芍、木瓜、苏木、大黄、油松节、续断、川芎、白芷、乳香、没药、冰片、樟脑、丁香、肉桂等29味药材组成,经炸药、炼油、下丹和去火毒等特殊工艺制成。具有祛风散寒、活血止痛的功效<sup>[1]</sup>,为国家基本药物<sup>[2-5]</sup>,经国家食品药品监督管理局数据库查询共有14家企业生产和20个批准文号,目前实际生产仅5家企业,5个批准文号。该品种自1995年起各版《中国药典》均有收载,但现行标准仅有性状、重量差异和软化点3个项目,对方中29味药味均未控制,项目均存在明显缺失。

中药特征图谱技术作为目前综合评价中药材或中成药的有效手段,其所提供的信息量远比任何单一成分测定所得的信息量要多,可以在很大程度上反映药材和成药的质量。基于中药特征图谱的技术特点以及狗皮膏质量研究的需求,笔者参考相关文献<sup>[6-10]</sup>,建立了气相色谱(GC)指纹图谱以评价狗皮膏的质量。参照《中药注射剂指纹图谱研究的技术要求(暂行)》的相关规定,本研究通过对5家生产企业32批狗皮膏的测定,拟定了狗皮膏的GC指纹图谱。

\*副主任药师。研究方向:中药质量标准、生物学方法在中药分析中的应用。电话:0592-5619848。E-mail:xmyjhhq@163.com

## 1 材料

### 1.1 仪器

6890N型GC仪(美国Agilent公司);105XS型电子天平、PL203型电子天平(瑞士Mettler-Toledo公司)。

### 1.2 药品与试剂

狗皮膏(企业A,批号:20101001、20110805,即A1~A2;企业B,批号:1010023、1104013,即B1~B2;企业C,批号:20110104、20100901、20110401、20110202、20110402、20110303、20101001、20110105、20110605、20110604,即C1~C10;企业D,批号:0210010、0210014、0210020、0210024、0210032、0210044、0210049、1210010、7210024、9210023、9210032,即D1~D11;企业E,批号:110221、101205、110403、110402、110201、110110、110107,即E1~E7);樟脑对照品(批号:110747-200507,纯度>98%)、龙脑对照品(批号:110881-200706,纯度:99.2%)、异龙脑对照品(批号:111512-200201,纯度>98%)、丁香酚对照品(批号:110725-201213,纯度:99.2%)、桂皮醛对照品(批号:110710-201217,纯度>98%)、乳香对照药材(批号:120970-200904)、没药对照药材(批号:120967-201104)、丁香对照药材(批号:121039-201004)、肉桂对照药材(批号:121363-201102)均购自中国食品药品检定研究院;乙酸乙酯为分析纯,水为纯化水。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

色谱柱:以交联聚乙二醇为固定相的弹性石英毛细管柱(30 m×0.25 mm×0.25 μm);程序升温(初始温度90℃,保持5 min,以5℃/min的速率升温至120℃,保持1 min;再以2℃/min的速率升温至150℃,最后以8℃/min的速率升温至220℃,保持22 min);进样口温度:220℃;检测器:氢火焰离子化检测器,检测器温度:250℃;分流进样量:1 μl,分流比:20:1。

### 2.2 溶液的制备

2.2.1 供试品溶液 取样品15 g,精密称定,置于500 ml烧瓶中,加水300 ml,连接挥发油测定器,自测定器上端加水并溢流入烧瓶为止,加乙酸乙酯3 ml,加热回流3 h,静置1 h,将挥发油测定器中的液体移至分液漏斗中,静置分层;分取乙酸乙酯层,并用乙酸乙酯洗涤水液及挥发油提取器提取3次,每次5 ml,合并乙酸乙酯,通过适量无水硫酸钠脱水得提取溶液,置于25 ml量瓶中,加乙酸乙酯定容,即得。

2.2.2 混合对照品溶液 取樟脑、异龙脑、龙脑、丁香酚和桂皮醛对照品适量,分别精密称定,置于同一量瓶中,加乙酸乙酯制成每1 ml分别含樟脑2 mg、异龙脑0.3 mg、龙脑0.6 mg、丁香酚2 mg和桂皮醛1 mg的混合对照品溶液。

2.2.3 对照药材溶液 取乳香、没药、丁香、肉桂对照药材各约0.2 g,按“2.2.1”项下方法制备对照药材溶液。

### 2.3 方法学考察

2.3.1 精密度的试验 取“2.2.2”项下混合对照品溶液适量,按“2.1”项下色谱条件连续进样测定6次,以丁香酚的保留时间和峰面积为参照,记录各共有峰相对保留时间和相对峰面积。结果,各共有峰相对保留时间和相对峰面积的RSD均<2%(n=6),表明仪器精密度良好。

2.3.2 稳定性试验 取“2.2.1”项下供试品溶液(批号:20101001)适量,分别于放置0、2、4、8、12、18、24 h时进样测定,以丁香酚的保留时间和峰面积为参照,记录各共有峰相对保留时间和相对峰面积。结果,各共有峰相对保留时间和相对峰面积的RSD均<2%(n=7),表明供试品溶液在24 h内基本稳定。

2.3.3 重复性试验 精密称取同一批样品(批号:20101001)适量,按“2.2.1”项下方法制备供试品溶液,共6份,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,以丁香酚的保留时间和峰面积为参照,记录各共有峰相对保留时间和相对峰面积。结果,各共有峰相对保留时间和相对峰面积的RSD均<3%(n=6),表明本方法重复性良好。

### 2.4 特征图谱的建立及共有峰指认

2.4.1 指纹图谱的建立 取5家生产企业32批狗皮膏各适量,按“2.2.1”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,得特征指纹图谱,叠加后,由于图谱差异大,效果不理想,因此先以每家生产企业各批狗皮膏特征指纹图谱进行叠加拟合,再对5家生产企业拟合图谱进行叠加,详见图1。

由图1可知,各生产企业样品在色谱行为上表现出极大差异。其中,企业A、B样品的指纹图谱提供了较为丰富的色谱

信息,尤其是原粉入药的樟脑、冰片、乳香、没药、丁香、肉桂这6味药材,均能找到相应特征峰。

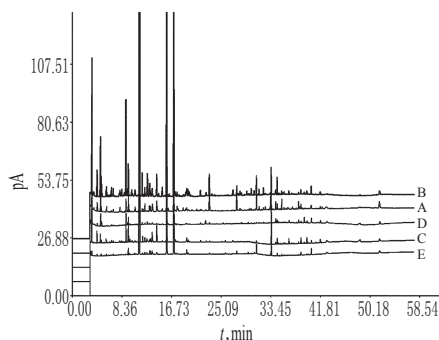


图1 5家生产企业狗皮膏气象色谱叠加图

Fig 1 Overlay plots of GC chromatograms of Goupi cream from 5 enterprises

2.4.2 狗皮膏对照图谱的生成 采用中药指纹图谱相似度计算软件(2009版)对32批狗皮膏对照图谱进行拟合。结果表明,32批狗皮膏共有11个特征峰。取“2.2”项下混合对照品溶液、对照药材溶液适量,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积,比较各个色谱峰的保留时间,归属上述11个特征峰的药材来源。其中,1、4号峰来源于没药,2、4、11号峰来源于乳香,3号峰来源于樟脑,5、6号峰来源于冰片,8号峰来源于肉桂,9号(S)峰来源于丁香。确认了其中5个特征峰的化学成分,分别为峰3(樟脑)、峰5(异龙脑)、峰6(龙脑)、峰8(桂皮醛)、峰S(丁香酚)。色谱见图2。

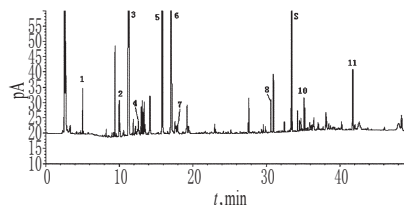


图2 32批狗皮膏共有峰气象色谱图

Fig 2 GC chromatograms of common peaks of 32 batches of Goupi cream

2.4.3 相似度分析 采用中药指纹图谱相似度计算软件(2009版)对32批狗皮膏对的相似度进行比较分析,结果见表1。

2.4.4 聚类分析 采用SPSS 19.0软件对32批狗皮膏进行聚类分析,采用组间联结法,度量标准采用平方Euclidean距离。结果,可聚为5类,其中E2~E7、C2、C9、C8、D4、D9、A2为一类,A1、D1、D3、D5~D8、D10~D11、B1~B2、C10、E1为一类,C1、C3为一类,C4~C5、C7、D2为一类,C6自成一类,与指纹图谱相似度分析结果基本一致,详见图3。

## 3 讨论

### 3.1 样品制备方法

本试验采用提取挥发油作为样品,可有效避免狗皮膏基质干扰。分别采用环己烷和乙酸乙酯作为挥发油的吸收溶剂,结果样品色谱图基本一致,故选择低毒环保的乙酸乙酯为吸收溶剂。笔者前期分别称取15、30、45 g样品提取挥发油,稀释至25 ml,进行检测,结果样品气相色谱图信息量基本一致,因此选用15 g样品进行检测。笔者预试验中分别提取2、3、4、5 h,结果3 h即可提取完全。

表1 32批狗皮膏气相特征图谱相似度

Tab 1 Similarity evaluation results of 32 batches of Goupi cream

生产企业	批号	相似度
A	20101001	0.939
	20110805	0.670
B	1010023	0.909
	1104013	0.850
C	20110104	0.509
	20100901	0.745
	20110401	0.477
	20110202	0.308
	20110402	0.329
	20110303	0.172
	20101001	0.295
	20110105	0.786
	20110605	0.803
	20110604	0.869
D	0210010	0.933
	0210014	0.307
	0210020	0.884
	0210024	0.674
	0210032	0.919
	0210044	0.878
	0210049	0.920
	1210010	0.888
	7210024	0.828
	9210023	0.892
E	9210032	0.868
	110221	0.862
	101205	0.707
	110403	0.734
	110402	0.752
	110201	0.735
	110110	0.795
	110107	0.768

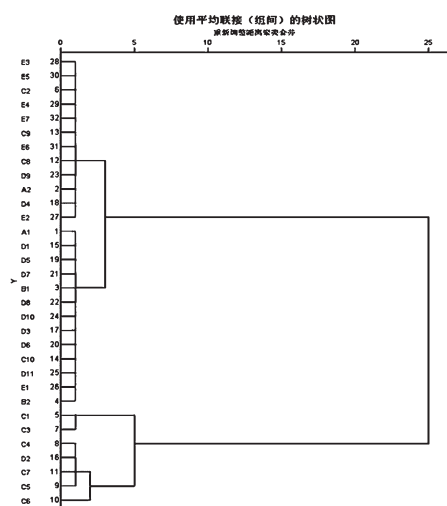


图3 32批狗皮膏GC对照特征图谱聚类分析

Fig 3 Cluster analysis of 32 batches of Goupi cream

3.2 指纹图谱相似度比较

狗皮膏处方中29味药材,除樟脑、冰片、乳香、没药、丁香、肉桂这6味药材未经过“炸药”工艺,其他23味药材在油炸过程中均损失了绝大部分的有效成分,因此原粉入药的这6味药

材对狗皮膏的最终质量发挥着极其重要的作用,对其进行质量分析是狗皮膏质量监控的关键。笔者分析了32批样品的GC指纹图谱,结果除丁香、樟脑和冰片外,其他3味药的检出水平均不理想,究其原因可能与生产企业使用的原料药材质量和工艺控制水平有关。笔者应用中药指纹图谱相似度计算软件(2009版)计算32批样品的相似度,发现各样品相似度差异较大,说明各企业的生产工艺缺乏一致性,关键工艺参数控制落后,产品质量不均一。

3.3 建议

各企业在狗皮膏生产中的炸药、炼油、下丹、去火毒、混药、摊涂等关键工艺控制水平上差异较大。个别生产企业以小锅制膏,依照老药工的经验,根据生产过程中油烟颜色变化和油花状态判断火候,未按批准的工艺温度条件生产。企业间生产规模差异大,且关键工艺无相应质控指标及验证程序。产品质量不均一,指纹图谱相似度低,不符合现代化生产对产品均一性的基本要求。建议在大生产中制膏过程既重视传统经验判断,亦须将其量化后传承保留,应用于现代化生产。

参考文献

[1] 孙鸿涛,谢国平,黎飞猛,等.狗皮膏外敷结合股四头肌耐力训练治疗膝骨性关节炎的临床观察[J].云南中医中药杂志,2014,35(6):52.

[2] 黄迪,陈洁,汪建君.狗皮膏安全性评价研究[J].药物评价研究,2013,36(2):104.

[3] 王震.精制狗皮膏药皮肤过敏试验研究[J].湖北科技学院学报:医学版,2013,27(1):46.

[4] 李帆帆,孟宪丽,赵贵琴.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.

[5] 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.

[6] 胡晓炜.GC法测定特制狗皮膏中薄荷脑、冰片、水杨酸甲酯的含量[J].中华中医药学刊,2013,31(6):1408.

[7] 胡丹,王静,曹红,等.GC法测定新型狗皮膏中樟脑的含量[J].解放军药学学报,2013,29(6):536.

[8] 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,2013,19(15):73.

[9] 黄惠琼,胡睿恩.GC法同时测定狗皮膏中樟脑、异龙脑、龙脑的含量[J].中国药品标准,2012,13(6):428.

[10] 黄澜,黄惠琼,李玲玲.正天丸的HPLC特征图谱研究[J].中国药房,2015,26(12):1713.

(收稿日期:2015-04-27 修回日期:2015-09-14)

(编辑:张静)