中图分类号：R917　　文献标志码：A　　文章编号：1006－4931(2024)12－0069－06
doi:10.3969/j.issn.1006－4931.2024.12.016

活血消痛酊挥发性成分的鉴定及含量测定

方　强[1]，郭　立[2△]，熊　伟[2]，姜家书[2]，左　杰[2]，高　琴[2]

（1. 河南省信阳市生态环境局光山分局，河南 信阳　465450；2. 河南羚锐制药股份有限公司，河南 信阳　465550）

摘要：目的　建立鉴定活血消痛酊中挥发性成分及测定其中 5 种指标性成分含量的气相色谱－质谱联用(GC－MS)法。**方法**　色谱柱为 Agilent PEG20M 毛细管柱(30 m×0.32 mm，0.25 μm)，程序升温，进样口温度为 230 ℃，载气为高纯氦气，流速为 1.0 mL/min，分流比为 5∶1(*V*/*V*)，进样量为 1 μL；采用电子轰击离子源(成分鉴定)或选择性离子监测模式(含量测定)，质量扫描范围为 *m*/*z* 40～500。**结果**　共鉴定出 37 种挥发性成分。3－蒈烯、桉油精、β－石竹烯、丁香酚、对甲氧基肉桂酸乙酯的质量浓度分别在 0.200 2～40.04 μg/mL、0.202 6～40.52 μg/mL、0.299 2～59.84 μg/mL、0.601 0～120.20 μg/mL、0.302 2～60.44 μg/mL 范围内与待测成分离子强度线性关系良好(R^2>0.999 0，n=7)；检测限分别为 3.11，2.94，3.29，7.58，4.35 ng/mL，定量限分别为 10.31，9.75，10.90，25.03，14.49 ng/mL；精密度、稳定性、重复性试验结果的 *RSD* 均小于 5%(n=6)；平均加样回收率分别为 93.01%，91.90%，94.69%，93.42%，92.70%，*RSD* 分别为 4.98%，5.53%，5.04%，4.29%，4.83%(n=9)。20 批样品中，上述 5 种成分的平均含量分别为 1.48，2.07，3.26，8.80，3.59 μg/mL。**结论**　该方法操作简便，结果准确，重复性好，可用于活血消痛酊挥发性成分的鉴定及含量测定。

关键词：活血消痛酊；挥发性成分；气相色谱－质谱联用法；成分鉴定；含量测定

Identification and Content Determination of Volatile Components in Huoxue Xiaotong Tincture

FANG Qiang[1], GUO Li[2], XIONG Wei[2], JIANG Jiashu[2], ZUO Jie[2], GAO Qin[2]

(1. Guangshan Branch of Xinyang Ecological Environment Bureau, Xinyang, Henan, China　465450;　2. Henan Lingrui Pharmaceutical Co., Ltd., Xinyang, Henan, China　465550)

Abstract: Objective　To establish a gas chromatography－mass spectrometry (GC－MS) method for identifying the volatile components in Huoxue Xiaotong Tincture and determining the contents of five indicator components. **Methods**　The chromatographic column was the Agilent PEG20M capillary column (30 m × 0.32 mm, 0.25 μm), the temperature was programmed, the inlet temperature was 230 ℃, the carrier gas was high－purity helium, the flow rate was 1.0 mL/min, the split ratio was 5∶1 (*V*/*V*), and the injection volume was 1 μL. The electron impact ion source (component identification) or selective ion monitoring mode (content determination) was adopted, the mass scanning range was *m*/*z* 40－500. **Results**　A total of 37 volatile components were identified. The linear ranges of 3－carene, cineole, β－caryophyllene, eugenol and ethyl p－methoxycinnamate were 0.200 2－40.04 μg/mL, 0.202 6－40.52 μg/mL, 0.299 2－59.84 μg/mL, 0.601 0－120.20 μg/mL, 0.302 2－60.44 μg/mL (R^2>0.999 0, n=7) respectively. The limits of detection (LOD) of the above five components were 3.11, 2.94, 3.29, 7.58, 4.35 ng/mL, and their limits of quantification (LOQ) were 10.31, 9.75, 10.90, 25.03, 14.49 ng/mL respectively. The *RSD*s of precision, stability, repeatability tests were all lower than 5% (n=6). The recovery rates of the above five components were 93.01%, 91.90%, 94.69%, 93.42%. 92.70%, with *RSD*s of 4.98%, 5.53%, 5.04%, 4.29%, 4.83%, respectively (n=9). Among the 20 batches of samples, the average contents of 3－carene, cineole, β－caryophyllene, eugenol and ethyl p－methoxycinnamate were 1.48, 2.07, 3.26, 8.80, 3.59 μg/mL respectively. **Conclusion**　This method is simple, accurate and repeatable, which can be used for the identification and content determination of volatile components in Huoxue Xiaotong Tincture.

Key words: Huoxue Xiaotong Tincture; volatile component; GC－MS; component identification; content determination

第一作者：方强，男，大学本科，高级工程师，研究方向为药物污染治理，(电子信箱)fangqiang76@126.com。

△**通信作者：**郭立，男，大学本科，工程师，研究方向为药剂学，(电子信箱)1007515754@qq.com。

量[J]. 河北化工，2004(4)：42－44.

[11] 罗　晶，柳小秦，安学霞，等. 顶空气相色谱法测定盐酸尼卡地平原料中残留溶剂含量[J]. 中国药业，2021，30(6)：44－46.

[12] 袁　林，陈　颖. 毛细管气相色谱法测定水杨酸苯酚贴膏中苯酚含量[J]. 中国药业，2018，27(24)：25－27.

[13] 刘　斌. 气相色谱法测定银柴颗粒中薄荷脑和薄荷酮含量[J]. 中国药业，2022，31(5)：79－81.

[14] 方永凯，赵群涛. 气相色谱法同时测定麝香止痛贴膏中冰片、薄荷脑和水杨酸甲酯含量[J]. 中国药业，2023，32(7)：78－81.

[15] 古炳明，邬伟魁，刘　佳. 气相色谱法测定胃痛片中 4 种化学成分含量[J]. 中国药业，2023，32(1)：75－78.

[16] 张德伟，袁　林，李洁玉，等. 气相色谱法测定胃蛋白酶中丙酮和异丙叉丙酮残留量[J]. 中国药业，2023，32(1)：66－69.

[17] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(四部)[M]. 北京：中国医药科技出版社，2020：116－120.

(收稿日期：2023－04－13；修回日期：2023－12－26)

活血消痛酊由当归、川芎、花椒、胡椒、丁香、肉桂、荜茇、干姜、山柰、红花、大黄、冰片、樟脑、薄荷脑14种中药材制成，可用于骨性关节炎引起的疼痛、沉困、活动不利等症的辅助治疗。中药挥发油因药效快、渗透性强[1]，在抗菌、抗炎、抗癌、抗病毒、促进透皮吸收等方面发挥着重要作用[2-4]。但不同的入药部位、产地、采收时期、提取工艺等会导致挥发油品质不均[5]，从而影响其临床疗效和用药安全。活血消痛酊现行国家药品标准中对挥发油指标的控制，仅对冰片、樟脑、薄荷脑药材和有效成分桂皮醛、丁香酚进行薄层色谱鉴别，未系统解析制剂的复杂成分，未从整体上判断中药的质量。鉴于此，本研究中采用气相色谱-质谱联用(GC-MS)法鉴定制剂中的挥发性成分，并测定其中5种指标性成分的含量，为活血消痛酊的质量控制提供参考。现报道如下。

1 仪器与试药

1.1 仪器

7820A-5977B型气相色谱质谱联用仪(美国Agilent公司)；XPE105型电子天平(瑞士Mettler Toledo公司，精度为0.01 mg)；挥发油测定器(北京北玻博美玻璃有限公司)。

1.2 试药

活血消痛酊(河南羚锐制药股份有限公司，批号分别为190801，190802，190803，190804，190805，201102，201103，201105，201107，201108，210105，210106，210107，210108，210109，220601，220602，220603，220604，220605，依次编号S1-S20)。樟脑对照品(批号为110747-201008，含量99.0%)，薄荷脑对照品(批号为110728-201707，含量99.8%)，龙脑对照品(批号为110881-201709，含量99.6%)，异龙脑对照品(批号为110512-201904，含量98.4%)，丁香酚对照品(批号为110725-201917，含量99.1%)，对甲氧基肉桂酸乙酯对照品(批号为110835-202005，含量99.4%)，桉油精对照品(批号为110788-202108，含量99.4%)，萘(批号为111673-201905，含量100%)，均购自中国食品药品检定研究院；β-石竹烯对照品(上海源叶生物科技有限公司，批号为Z02A9H67113，含量98.04%)；3-蒈烯对照品(上海阿拉丁生化科技股份有限公司，批号为C1912117，含量94.9%)；乙酸乙酯为分析纯，水为纯化水。

2 方法与结果

2.1 挥发性成分鉴定

2.1.1 试验条件

GC条件：色谱柱为Agilent PEG20M毛细管柱(30 m×0.32 mm，0.25 μm)，程序升温(初始温度为50 ℃、保持2 min，以10 ℃/min的速率升至125 ℃，保持10 min，以1 ℃/min的速率升至135 ℃、保持2 min，再以2 ℃/min的速率升至160 ℃、保持4 min，最后以2 ℃/min的速率升至199 ℃、保持25 min)；进样口温度为230 ℃；载气为高纯氦气；流速为1.0 mL/min；分流比为5∶1(*V*/*V*)；进样量为1 μL。

MS条件：离子源为电子轰击离子源(EI)；电子能量为70 eV；离子源温度为230 ℃；接口温度为230 ℃；四极杆温度为150 ℃；质量扫描范围为*m*/*z* 40~500，溶质延迟时间为4.6 min，230 ℃运行10 min，标准调谐[6]。

2.1.2 溶液制备

精密量取样品3 mL，置250 mL圆底烧瓶中，加蒸馏水100 mL，放入沸石5颗，照2020年版《中国药典(四部)》通则2204挥发油测定法试验。自挥发油测定器上端加水至溢流入烧瓶为止，加乙酸乙酯2 mL，连接回流冷凝管，加热至沸腾，保持微沸4 h，冷却至室温；分取乙酸乙酯液，通过内铺适量无水硫酸钠层的漏斗滤过，滤液置10 mL容量瓶中，加乙酸乙酯适量，依次洗涤冷凝管、挥发油测定器、漏斗，洗涤液与上述滤液合并，加乙酸乙酯定容，摇匀，滤过，即得供试品溶液。取3-蒈烯、桉油精、樟脑、β-石竹烯、薄荷脑、异龙脑、龙脑、丁香酚、对甲氧基肉桂酸乙酯对照品各适量，精密称定，加乙酸乙酯制成质量浓度分别为8.12，8.48，40.20，8.32，20.52，12.24，12.16，8.24，8.16 μg/mL的对照品溶液。

2.1.3 成分鉴定

取样品(编号为S20)适量，按2.1.2项下方法制备供试品溶液，按2.1.1项下试验条件进样分析，对全扫描总离子流图中各峰进行质谱扫描，得到相应的质谱图，经NIST17.0数据库检索，并结合相应对照品溶液离子流图，共鉴定出37种挥发性成分。结果见图1和表1。

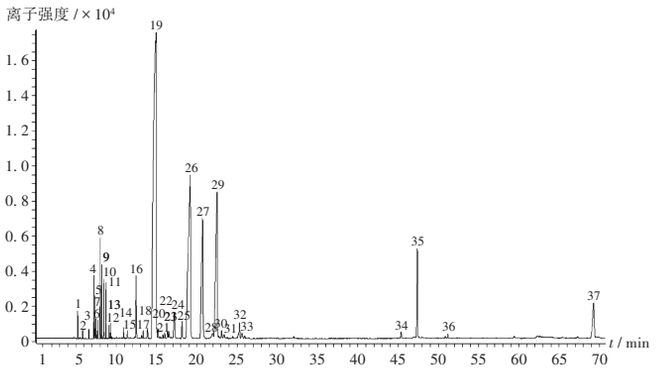


图1 活血消痛酊挥发性成分总离子流图

Fig. 1 Total ion chromatograms of volatile components in Huoxue Xiaotong Tincture

表 1 活血消痛酊中 37 种挥发性成分 GC－MS 鉴定结果

Tab. 1 Results of identification of 37 volatile components in Huoxue Xiaotong Tincture by GC－MS

序号	t_R(min)	化学成分	分子式	离子模式	m/z	归属	成分类别
1	5.211	cyclofenchene	$C_{10}H_{16}$	$[M+H]^+$	77.0,93.1	莪蒁、当归、川芎、干姜、花椒、胡椒	单萜类
				$[M+NH_4]^+$	121.1		
2	5.832	莰烯	$C_{10}H_{16}$	$[M+NH_4]^+$	79.0,121.1	胡椒	单萜类
				$[M+H]^+$	93.0,136.1		
3	6.608	β-蒎烯	$C_{10}H_{16}$	$[M+H]^+$	41.0,69.0,93.1	胡椒	单萜类
				$[M+NH_4]^+$	121.1		
4	7.229	3-蒈烯	$C_{10}H_{16}$	$[M+Na]^+$	77.1,121.1	当归、胡椒	单萜类
				$[M+H]^+$	93.1		
				$[M+NH_4]^+$	136.1		
5	7.359	月桂烯	$C_{10}H_{16}$	$[M+H]^+$	41.1	胡椒、花椒	单萜类
				$[M+NH_4]^+$	69.1,93.1		
6	7.482	α-水芹烯	$C_{10}H_{16}$	$[M+Na]^+$	77.0,93.1	胡椒、花椒	单萜类
				$[M+H]^+$	91.0,136.1		
7	7.702	α-松油烯	$C_{10}H_{16}$	$[M+Na]^+$	77.0,93.0,136.1	川芎、花椒	单萜类
				$[M+NH_4]^+$	121.1		
8	8.019	(*R*)-isocarvestrene	$C_{10}H_{16}$	$[M+NH_4]^+$	68.1,121.1	莪蒁、川芎、胡椒、花椒	单萜类
				$[M+Na]^+$	93.1		
				$[M+H]^+$	136.1		
9	8.187	桉油精	$C_{10}H_{18}O$	$[M+NH_4]^+$	43.0,93.1	川芎、干姜、花椒	单萜类
				$[M+Na]^+$	154.1		
10	8.446	β-罗勒烯	$C_{10}H_{16}$	$[M+NH_4]^+$	79.04,121.08	当归、花椒	单萜类
				$[M+H]^+$	93.07,105.03		
11	8.717	γ-松油烯	$C_{10}H_{16}$	$[M+H]^+$	77.02,91.05,	川芎、花椒	单萜类
				$[M+Na]^+$	93.07		
				$[M+NH_4]^+$	136.09		
12	9.112	4-异丙基甲苯	$C_{10}H_{14}$	$[M+Na]^+$	91.03	胡椒、花椒	单萜类
				$[M+NH_4]^+$	119.07		
				$[M+H]^+$	134.07		
13	9.293	4-蒈烯	$C_{10}H_{16}O$	$[M+Na]^+$	79.02	川芎、胡椒、花椒	单萜类
				$[M+NH_4]^+$	93.04,121.06		
				$[M+H]^+$	136.09		
14	10.917	(－)-α-莪澄茄油烯	$C_{15}H_{24}$	$[M+H]^+$	71.05	胡椒	倍半萜类
				$[M+Na]^+$	86.01,93.03		
				$[M+NH_4]^+$	139.06		
15	11.376	葑酮	$C_{10}H_{16}O$	$[M+Na]^+$	55.04	樟脑原料	单萜类
				$[M+H]^+$	81.03,97.07		
				$[M+NH_4]^+$	140.10		
16	12.463	grandlurelll	$C_{10}H_{16}O$	$[M+H]^+$	41.10,69.10	樟脑原料	单萜类
				$[M+NH_4]^+$	95.10,108.10		
17	13.342	正十五烷	$C_{15}H_{32}$	$[M+H]^+$	43.0,71.0	胡椒	烷类
				$[M+NH_4]^+$	57.0		
18	13.899	α-蒎烯	$C_{15}H_{24}$	$[M+Na]^+$	93.00,119.1	莪蒁	单萜类
				$[M+H]^+$	105.0		
				$[M+NH_4]^+$	204.1		
19	14.979	樟脑	$C_{10}H_{16}O$	$[M+H]^+$	55.00	樟脑原料	单萜类
				$[M+NH_4]^+$	81.0,97.1, 140.10		
20	15.031	(*Z*)-pinene hydrate	$C_{10}H_{16}O$	$[M+NH_4]^+$	43.00,121.10	樟脑原料	单萜类
				$[M+H]^+$	81.10		
21	16.001	5-Methyl-3-heptyne	C_8H_{14}	$[M+Na]^+$	41.00,95.0	薄荷脑原料	其他类
				$[M+H]^+$	81.00		
22	16.357	葑醇	$C_{10}H_{18}O$	$[M+NH_4]^+$	152.10	薄荷脑原料	单萜类
23	16.525	1,5,5-trimethyl-norbornan-2-ol	$C_{10}H_{18}O$	$[M+NH_4]^+$	95.10,121.10, 139.10	冰片原料	单萜类
24	17.178	β-石竹烯	$C_{15}H_{24}$	$[M+H]^+$	41.10	川芎、当归、丁香、干姜、胡椒	倍半萜类
				$[M+Na]^+$	93.10,133.10, 189.10		
25	18.174	左旋樟脑	$C_{10}H_{16}O$	$[M+NH_4]^+$	55.0,95.10, 108.10, 152.10	樟脑原料	单萜类
26	19.210	*L*-薄荷醇	$C_{10}H_{20}O$	$[M+Na]^+$	67.10	薄荷脑原料	单萜类
				$[M+H]^+$	71.10,95.10		
				$[M+NH_4]^+$	123.20		
27	20.723	异龙脑	$C_{10}H_{18}O$	$[M+H]^+$	67.10,110.10	冰片原料	单萜类
				$[M+Na]^+$	95.10		
				$[M+NH_4]^+$	121.10		
28	22.036	α-松油醇	$C_{10}H_{18}O$	$[M+NH_4]^+$	59.00,121.10	红花	单萜类
				$[M+Na]^+$	93.00		
				$[M+H]^+$	136.10		
29	22.528	龙脑	$C_{10}H_{18}O$	$[M+Na]^+$	55.10,95.10	冰片原料	单萜类
				$[M+NH_4]^+$	110.20,139.1		
30	23.084	姜油烯	$C_{15}H_{24}$	$[M+H]^+$	77.00	干姜	倍半萜类
				$[M+Na]^+$	93.10		
				$[M+NH_4]^+$	119.10,204.10		
31	23.408	α-himachalene	$C_{15}H_{24}$	$[M+H]^+$	69.00,161.10	干姜、肉桂、莪蒁	倍半萜类
				$[M+Na]^+$	93.00		
				$[M+NH_4]^+$	204.10		
32	25.297	2,5-cyclohexadien-1-one, 2,4,4-trimethyl-3-(3-oxo-1-butenyl)-, (*E*)-(9CI)	$C_{13}H_{16}O_2$	$[M+NH_4]^+$	71.00,161.10, 204.20	莪蒁	其他类
				$[M+H]^+$	95.10		
33	25.536	2-(5-异噁唑基)苯酚	$C_9H_7NO_2$	$[M+H]^+$	55.00,71.00, 95.10	莪蒁	其他类
				$[M+Na]^+$	136.10		
34	45.376	肉桂酸乙酯	$C_{11}H_{12}O_2$	$[M+H]^+$	77.00	山柰、干姜	脂肪酸酯类
				$[M+Na]^+$	103.00,176.00		
				$[M+NH_4]^+$	131.00		

续表 1　活血消痛酊中 37 种挥发性成分 GC－MS 鉴定结果

Continued Tab. 1　Results of identification of 37 volatile components in Huoxue Xiaotong Tincture by GC－MS

序号	t_R(min)	化学成分	分子式	离子模式	m/z	归属	成分类别
35	47.394	丁香酚	$C_{10}H_{12}O_2$	$[M+NH_4]^+$	77.10, 91.10, 164.10	肉桂、丁香	苯丙烷类
				$[M+H]^+$	149.10		
36	51.178	异丁香酚	$C_{10}H_{12}O_2$	$[M+NH_4]^+$	43.00, 149.00, 206.10	丁香	苯丙烷类
				$[M+Na]^+$	164.10		
37	69.290	对甲氧基肉桂酸乙酯	$C_{12}H_{14}O_3$	$[M+H]^+$	89.00	山柰	有机酸酯类

2.2　含量测定

2.2.1　试验条件

除 MS 条件采用选择性离子监测模式外，其余试验条件均同 2.1.1 项。MS 相关参数见表 2。

表 2　5 种指标性成分含量测定质谱参数

Tab. 2　Mass spectrometry parameters for content determination of five indicator components

待测成分	t_R(min)	定量离子 m/z	定性离子 m/z
3－蒈烯	7.229	154.1	81.1, 108.1, 139.1
桉油精	8.187	152.2	81.2, 95.2, 108.2
β－石竹烯	17.178	133.1	41.1, 69.1, 93.1, 161.1
丁香酚	47.394	164.1	55.1, 77.1, 103.1, 149.1
对甲氧基肉桂酸乙酯	69.29	206.1	134.1, 161.1

2.2.2　溶液制备

内标溶液：取萘 15.16 mg，精密称定，置 25 mL 容量瓶中，加乙酸乙酯溶解并定容，即得内标贮备液；精密吸取 1 mL，置 25 mL 容量瓶中，用乙酸乙酯定容，摇匀；精密吸取 1 mL，置 500 mL 容量瓶中，用乙酸乙酯定容，摇匀，即得。

混合对照品溶液：分别取 3－蒈烯、桉油精、β－石竹烯、丁香酚、对甲氧基肉桂酸乙酯对照品 10.01，10.13，14.96，30.05，15.11 mg，精密称定，置 25 mL 容量瓶中，加乙酸乙酯溶解并定容，即得单一对照品贮备液。分别精密吸取 1 mL，置同一 500 mL 容量瓶中，用乙酸乙酯定容，摇匀，即得质量浓度分别为 0.800 8，0.810 4，1.196 8，2.404 0，1.208 8 μg/mL 的混合对照品溶液。

供试品溶液：同 2.1.2 项下供试品溶液制备方法中“精密量取样品 3 mL”至“洗涤液与上述溶液合并”操作，用乙酸乙酯定容，摇匀，即得。

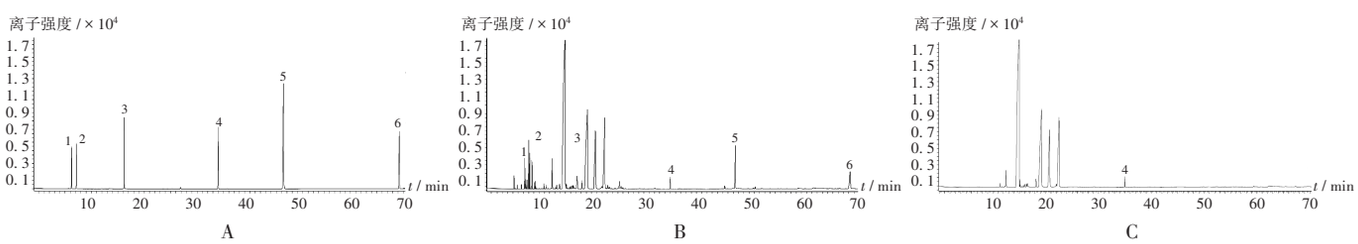
阴性对照品溶液：按活血消痛酊处方及工艺制备缺当归、川芎、山柰、肉桂、丁香、花椒、干姜、胡椒、荜茇药材的阴性样品，按 2.2.2 项下供试品溶液制备方法制备阴性对照品溶液。

2.2.3　方法学考察

专属性试验：取 2.2.2 项下混合对照品溶液、供试品溶液、阴性对照品溶液各适量，按 2.2.1 项下试验条件进样测定，记录色谱图。结果阴性对照品溶液图谱中，在与 3－蒈烯、桉油精、β－石竹烯、丁香酚、对甲氧基肉桂酸乙酯对照品溶液图谱相同保留时间处无干扰峰。详见图 2。

线性关系考察：取 5 种对照品适量，精密称定，加乙酸乙酯溶解，制成系列单一对照品溶液。按 2.2.1 项下试验条件进样测定，记录峰面积。以待测成分质量浓度（X，μg/mL）为横坐标、待测成分离子强度（Y）为纵坐标进行线性回归。结果见表 3。

检测限与定量限确定：取 2.2.3 方法学考察中“线性关系考察”项下 3－蒈烯、桉油精、β－石竹烯、丁香酚、对甲氧基肉桂酸乙酯质量浓度分别为 0.400 4，0.405 2，0.598 4，1.202，0.604 4 μg/mL 的混合对照品溶液，精密加入内标溶液 0.5 mL，用乙酸乙酯逐级稀释，按 2.2.1 项下试验条件进样测定，以信噪比分别为 3∶1、10∶1 时的质量浓度为检测限和定量限。结果见表 3。



1. 3－蒈烯　2. 桉油精　3. β－石竹烯　4. 萘（IS）　5. 丁香酚　6. 对甲氧基肉桂酸乙酯

A. 混合对照品溶液　B. 供试品溶液　C. 阴性对照品溶液

图 2　离子流图

1. 3－Carene　2. Cineole　3. β－Caryophyllene　4. Naphthalene（IS）　5. Eugenol　6. Ethyl p－methoxycinnamate

A. Mixed reference solution　B. Test solution　C. Negative reference solution

Fig. 2　Ion chromatograms

表3 线性关系、检测限、定量限考察及加样回收试验结果（$n=7$）

Tab. 3 Results of the linear relation test, LOD and LOQ investigation and the recovery test ($n=7$)

待测成分	回归方程	R^2	线性范围（μg/mL）	检测限（ng/mL）	定量限（ng/mL）	平均回收率（%）	*RSD*（%）
3-蒈烯	$Y_1=0.576\,5X_1+0.139\,3$	0.999 3	0.200 2～40.04	3.11	10.31	93.01	4.98
桉油精	$Y_2=0.814\,8X_2-0.176\,3$	0.999 2	0.202 6～40.52	2.94	9.75	91.90	5.53
β-石竹烯	$Y_3=0.825\,8X_3+0.393\,2$	0.999 1	0.299 2～59.84	3.29	10.90	94.69	5.04
丁香酚	$Y_4=0.893\,4X_4+0.907\,0$	0.999 2	0.601 0～120.20	7.58	25.03	93.42	4.29
对甲氧基肉桂酸乙酯	$Y_5=0.843\,9X_5+0.383\,9$	0.999 3	0.302 2～60.44	4.35	14.49	92.70	4.83

精密度试验：取2.2.2项下混合对照品溶液适量，精密加入内标溶液0.5 mL，按2.2.1项下试验条件连续进样测定6次，记录离子强度。结果3-蒈烯、桉油精、β-石竹烯、丁香酚、对甲氧基肉桂酸乙酯离子强度的*RSD*分别为4.13%，4.46%，3.58%，2.98%，4.66%（$n=6$），表明仪器精密度良好。

稳定性试验：取2.2.2项下供试品溶液（编号为S20）适量，精密加入内标溶液0.5 mL，于室温放置0，2，4，8，12，24 h时按2.2.1项项下试验条件进样测定，记录离子强度。结果3-蒈烯、桉油精、β-石竹烯、丁香酚、对甲氧基肉桂酸乙酯峰离子强度的*RSD*分别为4.32%，4.55%，4.03%，3.95%，4.59%（$n=6$），表明供试品溶液室温下放置24 h内较稳定。

重复性试验：取样品（编号为S20）适量，共6份，按2.2.2项下方法制备供试品溶液，精密加入内标溶液0.5 mL，按2.2.1项下试验条件进样测定，记录离子强度。采用内标法计算，结果的平均含量分别为1.46，1.23，3.44，12.41，4.49 μg/mL，*RSD*分别为4.35%，4.43%，4.14%，4.01%，4.62%（$n=6$），表明方法重复性良好。

加样回收试验：取3-蒈烯、桉油精、β-石竹烯、丁香酚、对甲氧基肉桂酸乙酯对照品各适量，精密称定，加乙酸乙酯配制成每1 mL含上述成分1.12，0.95，2.60，9.35，3.40 μg的混合对照品溶液。精密量取已知含量的样品（编号为S20）1.5 mL，各9份，置250 mL圆底烧瓶中，分别加入内标溶液0.5 mL及混合对照品溶液1，2，3 mL（各3份），按2.2.2项下方法制备供试品溶液，按2.2.1项下试验条件进样测定，记录离子强度，并计算加样回收率。结果见表3。

2.2.4 样品含量测定

取20批样品各适量，按2.2.2项下方法制备供试品溶液，精密加入内标溶液0.5 mL，按2.2.1项下试验条件进样测定，并按内标法计算含量。结果见表4。

表4 样品含量测定结果（μg/mL，$n=2$）

Tab. 4 Results of content determination of five indicator components in samples (μg/mL, $n=2$)

编号	3-蒈烯	桉油精	β-石竹烯	丁香酚	对甲氧基肉桂酸乙酯
S1	5.21	2.74	5.09	13.05	5.81
S2	1.41	2.23	2.90	7.46	2.85
S3	1.04	2.65	2.81	4.73	2.53
S4	1.57	2.33	3.14	8.67	3.06
S5	1.05	1.88	2.52	5.04	2.26
S6	1.02	1.85	2.68	6.55	2.44
S7	1.39	2.31	3.37	8.11	4.60
S8	1.04	1.74	2.81	8.33	3.32
S9	1.13	1.64	2.87	6.88	2.48
S10	1.12	2.13	3.29	10.15	2.93
S11	1.05	1.68	2.62	6.36	2.01
S12	1.01	1.83	2.38	4.62	2.43
S13	1.13	1.65	3.11	4.72	2.41
S14	1.38	2.38	4.03	13.71	3.75
S15	1.29	2.26	3.10	11.64	4.02
S16	1.55	2.41	3.90	10.18	4.82
S17	1.51	2.01	3.48	11.15	5.47
S18	1.45	2.45	3.95	12.13	5.52
S19	1.87	2.08	3.66	10.02	4.51
S20	1.46	1.23	3.44	12.41	4.49
$\bar{X}$	1.48	2.07	3.26	8.80	3.59

3 讨论

3.1 指标成分选择

活血消痛酊药味较多，处方复杂，已有文献报道了GC法测定活血消痛酊中樟脑、冰片、薄荷脑的含量[7]。本研究中排除樟脑、冰片、薄荷脑原料成分，采用GC-MS法分析药材中的挥发性成分并进行优选，以相对峰面积>0.5%、峰形对称、分离度较好的成分为研究对象。因grandlurelll、（*R*）-isocarvestrene对照品不易购买，故待后续研究。含量测定5个成分中，3-蒈烯是自然界中少数含有三元环结构的手性源化合物，具有明显的抗炎、防腐、抑菌作用[8]；桉油精药理活性丰富且复杂，药用价值较高，具有抗炎、镇痛、抗氧化、抗肿瘤、镇静、抑菌、促渗等作用，对关节炎疼痛有良好的药理作用[9]；β-石竹烯具有局部麻醉、抗炎、驱蚊虫、抗焦虑、抗抑郁作用[10]；丁香酚透皮吸收良好，具有明显的杀

菌、抗炎、镇痛、解热、局部麻醉作用[11-12]；对甲氧基肉桂酸乙酯为山柰中含量最高的挥发性成分，具有镇痛、抗感染、抗癌、抑菌、防晒等功效，是山柰药材质量控制的指标成分[13-14]。

3.2 提取方法选择

以可识别色谱峰的个数、峰形、分离情况和单位体积供试品色谱峰峰面积为评价指标进行分析，分别考察提取溶剂的种类及用量、样品用量、提取时间。结果表明，石油醚（60～90 ℃）、二甲苯提取的丁香酚、对甲氧基肉桂酸乙酯、β-石竹烯、桉油精、3-蒈烯的单位体积供试品色谱峰峰面积较乙酸乙酯小，且以乙酸乙酯提取时可识别色谱峰最多（37个），故优选乙酸乙酯为提取溶剂。乙酸乙酯用量从1 mL增至2 mL，可识别的色谱峰个数、单位体积供试品色谱峰峰面积均逐渐增加，用量继续增加时，上述2个指标均无明显变化，故优选乙酸乙酯用量为2 mL。活血消痛酊用量为1 mL时，可识别色谱峰为12个；随着其用量的增加，可识别色谱峰逐渐增多；超过3 mL，可识别色谱峰数量基本不再增加（稳定在37个）；增至55 mL时，乙酸乙酯提取液分层效果较差。故为节约样品和环保，优选活血消痛酊用量为3 mL。提取时间为2 h时，可识别色谱峰为23个；为4，6，8 h时，可识别色谱峰个数为37个并保持稳定，5个指标性成分的单位体积供试品色谱峰峰面积在提取4，6，8 h时较提取2 h高，但无明显差异，故优选提取时间为4 h。

3.3 方法评价

中成药疗效的发挥通常是多种成分协同作用的结果，处方中各味中药的剂量和比例会影响药效，多指标质量控制方法不仅能反映制剂的工艺水平，在一定程度上也能反映药材的质量，通过对多指标成分的分离测定可客观地反映传统中药的配伍状况，更符合中医理论[15-17]。本研究中采用GC-MS法鉴定了活血消痛酊中的37种挥发性成分，并实现了5种指标性成分的含量测定，结果准确可靠，可为活血消痛酊整体质量的评价提供参考。

参考文献

[1] LAN Y, WU Q, MAO YQ, et al. Cytotoxicity and enhancement activity of essential oil from Zanthoxylum bungeanum Maxim. as a natural transdermal penetration enhancer[J]. J Zhejiang Univ-Sci B(Biomed & Biotechnol), 2014, 15(2): 153-164.
[2] FOX LT, GERBER M, PLESSIS JD, et al. Transdermal drug delivery enhancement by compounds of natural origin [J]. Molecules, 2011, 16(12): 10507-10540.
[3] 张建林，陶 玲，管咏梅，等. 中药挥发油的促透皮吸收作用及在外用制剂研究中的问题分析[J]. 中草药，2017，48(24)：5263-5269.
[4] 黄罗生，顾燕飞，李 红. 中药挥发油及芳香性药物的研究进展[J]. 中国中药杂志，2009，34(12)：1605-1611.
[5] 李 聪，黄诗雨，陈丽华，等. 药材部位、产地及采收期对中药挥发油成分的差异性分析[J]. 中草药，2020，51(20)：5395-5404.
[6] 柳小莉，黄小英，张小飞，等. 基于GC-MS成分分析结合网络药理学预测当归挥发油质量标志物（Q-Marker）[J]. 中草药，2021，52(9)：2696-2706.
[7] 王艳伟，李桂本，代雪平. 气相色谱法测定活血消痛酊中樟脑、薄荷脑、龙脑和异龙脑的含量[J]. 西北药学杂志，2019，34(5)：612-614.
[8] 何丽芝，王 婧，赵振东，等. 3-蒈烯资源及其生物活性应用研究进展[J]. 林产化学与工业，2011，31(3)：122-126.
[9] 侯明赭，常 聪，陈林霖，等. 桉油精的药理作用研究进展[J]. 中国现代应用药学，2021，38(16)：2023-2032.
[10] 刘晓宇，陈旭冰，陈光勇. β-石竹烯及其衍生物的生物活性与合成研究进展[J]. 林产化学与工业，2012，32(1)：104-110.
[11] 王 萍，汪镇朝，刘英孟，等. 丁香挥发油的化学成分与药理作用研究进展[J]. 中成药，2022，44(3)：871-878.
[12] 李莎莎，李 凡，李 芳，等. 丁香的化学成分与药理作用研究进展[J]. 西北药学杂志，2021，36(5)：863-868.
[13] 吴艳婷，陈桂添，时 军，等. 山柰醋炙前后对甲氧基肉桂酸乙酯含量与抗感染镇痛作用变化研究[J]. 广东药学院学报，2016，32(6)：679-682.
[14] 郭 焱. 祖卡木颗粒中8个成分的含量测定及聚类分析[J]. 中国药师，2022，23(5)：849-852.
[15] 南 洋，徐 鹏，丁 宏，等. 现代分析技术在中药质量评价中的应用[J]. 环球中医药，2015，8(11)：1421-1424.
[16] 王巧清. 基于指纹图谱分析和多成分同时定量的玉屏风丸质量评价[J]. 中国药业，2020，29(5)：111-116.
[17] 李友露，徐 剑，缪艳燕，等. 基于高效液相色谱指纹图谱和多成分含量的淫羊藿传统饮片、破壁粉与破壁饮片比较[J]. 中国药业，2022，31(9)：44-49.

（收稿日期：2023-04-23；修回日期：2024-02-19）

中国科技核心期刊 中国科技论文统计源期刊
《中国药业》杂志 欢迎投稿！ 欢迎订阅！
邮发代号：78-130，各地邮局均可订阅；补订、破月订可向本刊办理。电话兼传真：（023）86592565
网上投稿：http://www.zhongguoyaoye023.com或中国药业在线投稿系统