

荆芥穗挥发油的顶空气相色谱指纹图谱研究

张 丽, 邵 霞, 于 生, 包贝华, 丁安伟*

南京中医药大学 江苏省方剂高新技术研究重点实验室, 江苏 南京 210046

摘 要: **目的** 建立荆芥穗挥发油的顶空气相色谱 (HSGC) 指纹图谱分析方法, 为全面控制和评价荆芥穗挥发油的质量提供依据。**方法** 采用 HSGC 法, 以胡薄荷酮为参照物对 10 批荆芥穗挥发油进行指纹图谱分析。顶空条件: 以 DMF 为初溶剂, 水为终溶剂; 顶空瓶体积为 10 mL, 取样体积为 5 mL, 顶空恒温温度为 90 ℃, 平衡时间为 40 min, 进样量为 0.5 mL, 进样方式为气体。色谱柱为 HP-5 (30 m×0.53 mm, 2.65 μm), 进样器温度为 220 ℃, 检测器温度为 250 ℃, 程序升温: 初始 30 ℃, 保持 5 min; 5 ℃/min 升至 90 ℃, 保持 2 min; 2 ℃/min 升至 160 ℃; 10 ℃/min 升至 200 ℃, 保持 3 min。**结果** 建立了荆芥穗挥发油 HSGC 指纹图谱共有模式, 标定了 11 个共有峰, 10 批荆芥穗挥发油的相似度均在 0.9 以上。**结论** 该指纹图谱方法简便、重复性好, 可专属地研究荆芥穗挥发油的指纹图谱并为全面控制荆芥穗挥发油的内在质量提供依据。

关键词: 荆芥穗挥发油; 胡薄荷酮; 顶空气相色谱 (HSGC); 指纹图谱; 质量控制

中图分类号: R286.02 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2012)09-1767-03

HSGC fingerprint of volatile oil in *Schizonepetae Spica*

ZHANG Li, SHAO Xia, YU Sheng, BAO Bei-hua, DING An-wei

Jiangsu Key Laboratory for TCM Formulae Research, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China

Key words: volatile oil in *Schizonepetae Spica*; pulegone; headspace gas chromatography (HSGC); fingerprint; quality control

荆芥穗为唇形科荆芥属植物荆芥 *Schizonepeta tenuisfolia* Briq. 的干燥花穗, 富含挥发油^[1], 其挥发油具有解表、清热解毒之功效^[2], 是常用解表药的原料药, 其主要有效成分为胡薄荷酮等薄荷烷型单萜类化合物, 且质量分数超过 50%^[3-4]。目前报道较多的是采用 GC-MS 技术分析其挥发油成分^[5], 而未见有系统的指纹图谱研究报道。

挥发油类成分指纹图谱通常采用 GC 直接进样法, 但若是制剂则需提取挥发油后方能测定, 按照《中国药典》2010 年版挥发油的测定法, 则需较多的制剂, 易造成厂家留样量大的负担。顶空气相色谱 (headspace gas chromatography, HSGC) 法进行挥发性成分的测定具有样品需要量小、前处理简单、液体样品定量准确等优点, 因此是以挥发性成分为主要成分的制剂指纹图谱及定量研究的较好方法^[6]。鉴于此, 本实验采用 HSGC 法对荆芥穗挥发油进行指纹图谱的初步研究, 以胡薄荷酮为内参比峰, 研

究了 11 个色谱峰, 并采用对照品对照及 GC-MS 法对 11 个共有峰进行了归属, 以期对荆芥穗挥发油的内在质量控制提供一个较全面的方法。

1 仪器与材料

Agilent 4890 气相色谱仪 (包括 FID 检测器, Certy 化学工作站软件)。Agilent GC 6890 MS 型气相色谱-质谱联用仪, 配 NIST05a 标准谱库。

(一) 薄荷酮对照品 (批号 111705-200501, 购自中国药品生物制品检定所); β-月桂烯、胡薄荷酮对照品 (批号分别为 128080050、11121CE, 质量分数均 ≥98%, 美国 Aldrich 公司); β-柠檬烯、β-石竹烯 (批号分别为 P0441、C0796, 日本化学工业有限公司)。其余试剂均为分析纯。

荆芥穗挥发油原药材来源于唇形科植物荆芥 *Schizonepeta tenuisfolia* Briq. 的干燥花穗, 药材购自亳州药材市场, 产地为河北安国, 经南京中医药大学陈建伟教授鉴定为唇形科植物荆芥的干燥花穗,

收稿日期: 2011-12-23

基金项目: 国家“十一五”重大新药创制项目 (2009ZX09103-339); 中医药行业科研专项 (201007012-1-1); 江苏高等学校优秀科技创新团队支持计划 (2009 年度); 江苏高校优势学科建设工程资助项目 (ysxk-2010)

作者简介: 张 丽 (1971—), 女, 教授, 南京中医药大学药学院中药分析教研室主任, 研究方向为中药炮制与质量控制。

Tel: 13851472740 E-mail: zhangli@njutcm.edu.cn

***通讯作者** 丁安伟 Tel: (025)85811523 E-mail: awding105@163.com

网络出版时间: 2012-08-16 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/12.1108.R.20120816.1038.001.html>

经水蒸气蒸馏中试得 10 批荆芥穗挥发油 (编号 jsy-1~10, 批号为 20090112、20090118、20090317、20090328、20090330、20090331、20090401、20090402、20090403、20090405), 提取后的挥发油经冷冻去冰脱水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

2.1.1 HSGC 条件 以 *N,N*-二甲基甲酰胺 (DMF) 为初溶剂, 以水为终溶剂; 顶空瓶体积 10 mL, 顶空瓶温度 90 °C, 取样体积 5 mL, 进样量 0.5 mL, 平衡时间 40 min, 进样方式: 气体。色谱柱为弹性石英毛细管柱 HP-5 (30 m×0.53 mm, 2.65 μm), 进样器温度 220 °C, 检测器温度 250 °C, 程序升温: 初始 30 °C, 保持 5 min; 5 °C/min 升至 90 °C, 保持 2 min; 2 °C/min 升至 160 °C; 10 °C/min 升至 200 °C, 保持 3 min; 柱前压 35 kPa, 理论塔板数按胡薄荷酮峰计算不低于 10 000。

2.1.2 GC-MS 条件 色谱柱为 HP-5MS 毛细管柱 (30 m×0.25 mm, 0.25 μm), 顶空瓶体积 10 mL, 进样口温度 200 °C, 分流进样 (分流比 3:1), 载气为氦气, 体积流量 1.0 mL/min, 进样时间 1 min, EI 源温度为 230 °C, 四极杆温度为 150 °C, EM 电压为 1 100 V, 进样量 1.0 mL, 质量扫描范围 30~550 amu。程序升温条件同“2.1.1”项下方法。

2.2 对照品溶液的制备

取胡薄荷酮对照品 50 mg, 精密称定, 置 10 mL 量瓶中, 以 DMF 为初溶剂溶解并稀释至刻度, 精密量取 1 mL 置 100 mL 量瓶中, 加重蒸水至刻度, 即得。

2.3 供试品溶液的制备

取挥发油 0.1 g, 精密称定, 置 10 mL 量瓶中, 以 DMF 为初溶剂溶解并稀释至刻度, 精密量取 1 mL 置 100 mL 量瓶中, 加重蒸水至刻度, 即得。

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度试验 取批号为 20090402 (jsy-8) 的供试品溶液 6 份, 连续进样, 记录色谱图。结果表明, 各共有峰的相对保留时间和相对峰面积比值 RSD 均小于 3.0%, 符合指纹图谱要求。

2.4.2 稳定性试验 取批号为 20090402 (jsy-8) 的供试品溶液, 分别在 0、4、6、10、24 h 进行检测, 记录色谱图。结果表明, 室温保存下的荆芥穗挥发油供试品溶液中各共有色谱峰的相对保留时间与相对峰面积比值 RSD 均小于 3.0%, 符合指纹图谱要求。

2.4.3 重复性试验 取批号为 20090402 (jsy-8) 的供试品 6 份, 依法测定, 记录色谱图。结果表明, 各共有色谱峰的相对保留时间和相对峰面积比值 RSD 均小于 3.0%, 符合指纹图谱要求。

2.5 样品测定

分别精密量取对照品溶液与 10 批供试品溶液各 5 mL 置 10 mL 顶空瓶中, 加顶空瓶专用隔垫密封, 置烘箱中, 于 90 °C 下恒温 40 min。分别吸取顶空气体 0.5 mL 注入气相色谱仪分析, 记录色谱图。计算相对保留时间和相对峰面积比值, 与标准指纹图谱对照, 10 批荆芥穗挥发油的 HSGC 叠加图见图 1。

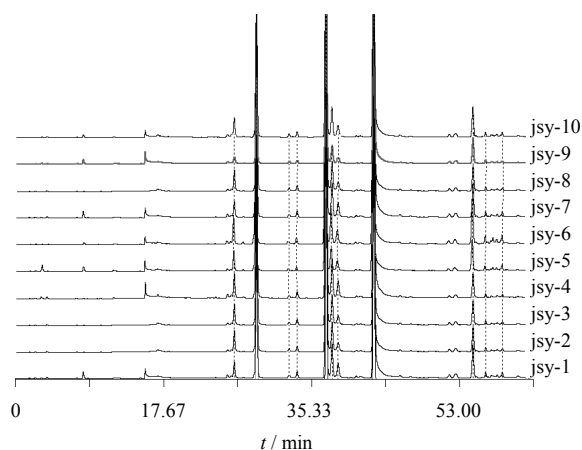


图 1 10 批荆芥穗挥发油的 HSGC 指纹图谱

Fig. 1 HSGC fingerprint of ten batches of volatile oil in *Schizonepetae Spica*

2.6 指纹图谱的建立

2.6.1 参比峰的选择 胡薄荷酮为荆芥穗挥发油中主要有效成分, 在各批样品中均出现 (第 8 号峰) 且与其他峰分离良好, 峰面积较大, 故确定胡薄荷酮色谱峰为参比峰。

2.6.2 荆芥穗挥发油 HSGC 指纹图谱的建立及相似度评价 将所得的 10 批荆芥穗挥发油的 HSGC 图谱以 AIA 格式依次导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004A 版》(研究版) 软件, 以 jsy-5 号荆芥穗挥发油的谱图作为参照谱进行指纹匹配, 确定了 11 个共有峰, 建立了荆芥穗挥发油指纹图谱的共有模式, 见图 2, 并进行了相似度计算, 10 批样品指纹图谱相似度分别为 0.989、0.991、0.983、0.983、0.999、0.990、0.997、0.985、0.993、0.990, 均在 0.9 以上。符合指纹图谱要求。以胡薄荷酮为参照物 (R 号峰), 其保留时间和峰面积为 1, 计算其他各共有峰的相对保留时间和相对峰面积, 得 11 个共有峰

的相对保留时间的平均值为 0.610、0.672、0.763、0.785、0.866、0.883、0.900、1.000、1.278、1.313、1.360；11 个共有峰的相对峰面积的 RSD 为 3.91%、1.03%、2.89%、5.98%、0.95%、2.63%、3.99%、0.00%、3.58%、4.45%、5.75%。

2.6.3 共有峰的归属 采用对照品对照与 NIST05a 标准谱库对荆芥穗挥发油对照指纹图谱中的 11 个共有色谱峰进行归属。其中 1、2、5、8、9 号峰采用对照品对照法确定为 β -月桂烯、 β -柠檬烯、薄荷酮、胡薄荷酮、 β -石竹烯，3、4、6、7、10、11 号峰采用 NIST05a 标准谱库检索确定为 2-甲基-1-丙烯基苯、乙酸辛烯酯、异薄荷酮、异胡薄荷酮、丁香烯、杜松烯，谱库检索匹配度均大于 90%，见图 2。

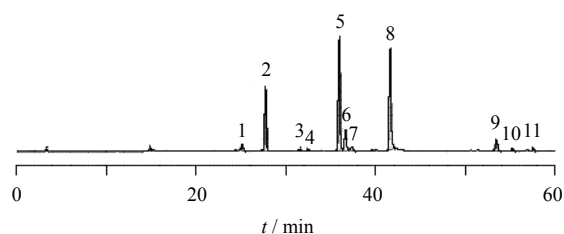


图2 荆芥穗挥发油 HSGC 指纹图谱共有模式及共有峰标识

Fig. 2 Mutual modes and common peaks of HSGC fingerprint of volatile oil in *Schizonepetae Spica*

3 讨论

选择了 3 种色谱柱：HP-5 (Crosslinked 5% PH Me siloxane, 30 m×0.53 mm, 2.65 μ m)、HP-35 (Crosslinked 35% PH Me siloxane, 30 m×0.53 mm, 2.65 μ m)、HP-Innowax (PEG-20M, 30 m×0.53 mm, 1 μ m)，结果显示，HP-35 与 HP-Innowax 总体分离情况与 HP-5 相比较差，因此选用 HP-5 色谱柱。

程序升温条件考察结果表明，当升温速率大于 2.5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 时，5 号薄荷酮色谱峰与其相邻色谱峰未达到基线分离。因此确定升温速率为 2 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 。

液体顶空分析时最好以水为终溶剂以消除溶剂峰的干扰，但由于荆芥穗挥发油在水中溶解度较差，因此采用先以有机溶剂配制成高质量浓度的溶液，再以重蒸水稀释的方法。对初溶剂的选择主要从以下 3 个方面考虑：一、溶剂响应小；二、不掩盖样品信息；三、样品与初溶剂作用力弱，蒸气压高，在含初溶剂的水中易挥发，从而提高方法的灵敏度。以乙醇、二甲亚砜 (DMSO) 与 DMF 作为初溶剂的考察结果表明以乙醇为初溶剂时，溶剂峰出峰较早，且溶剂峰响应较大，易掩盖样品信息；以

DMSO 为初溶剂时，溶剂响应仍然较大，且各主要成分响应较以 DMF 为溶剂的小。综上，确定 DMF 为初溶剂。

对平衡温度的考察结果表明，当顶空分析的平衡温度低于 60 $^{\circ}\text{C}$ 时，检出峰的数目较少，当温度高于 90 $^{\circ}\text{C}$ ，虽然薄荷酮与胡薄荷酮的峰面积有所增加，但在高温下， β -柠檬烯和 β -月桂烯的色谱峰明显变小，且 β -月桂烯色谱峰前面新出现一色谱峰，说明顶空气体成分已发生改变，推测为在高温下部分成分不稳定，易分解所致。综上，顶空分析的平衡温度最终选定为 90 $^{\circ}\text{C}$ 。

对平衡时间的考察结果表明，当平衡时间为 40 min 时，检出峰数目已比较平稳，主要色谱峰胡薄荷酮的峰面积值也增加缓慢，且过大的峰面积易造成色谱柱的超载。因此平衡时间最终确定为 40 min。

对不同气液比的考察结果表明，随着顶空分析中气液比的减少，检出峰数明显增加，当顶空分析的气液比为 5:5 时，检出峰数目已比较平稳，且主要色谱峰胡薄荷酮的峰面积值也增加缓慢，同时 5 mL 便于准确定量，故确定顶空分析气液比为 5:5。

对进样量的考察结果表明，当进样量为 0.3 mL 时，检出峰数目较少，当进样量达 0.5 mL 以上时，检出峰数目趋于平稳；且过大的进样量，易造成色谱柱的超载，因此，荆芥穗挥发油顶空分析的进样量选择为 0.5 mL。

相较于 GC-MS 法，本法所建立的荆芥穗挥发油 HSGC 指纹图谱具有仪器成本低、简便易行、适于普遍推广的优点，为荆芥穗资源的全面质量控制及进一步开发利用提供了依据。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [2] 赵璐, 曾南, 唐永鑫, 等. 荆芥挥发油对大鼠胸腔白细胞 5-脂氧酶活性的影响 [J]. 中国中药杂志, 2008, 33(17): 2154-2157.
- [3] 张丽, 丁安伟, 施月芹. 荆芥穗挥发油中薄荷酮、胡薄荷酮的含量测定 [J]. 南京中医药大学学报, 2008, 24(1): 45-47.
- [4] 张丽, 曹雨诞, 孔铭, 等. 荆芥穗挥发油的质量标准研究 [J]. 中草药, 2006, 37(2): 216-217.
- [5] 杨智蕴, 闫吉昌, 张殊佳, 等. 荆芥穗挥发油化学成分的研究 [J]. 中草药, 1996, 27(7): 397.
- [6] 张海霞, 陈建伟, 吴志平. 肉桂及其混伪品的 HSGC-MS 的实验比较研究 [J]. 中草药, 2003, 34(1): 76-77.