

双鱼颗粒挥发性成分指纹图谱和定量分析

林 夏^{1,2}, 崔培超^{1,2}, 王 雪^{1,2}, 胡晗绯^{1,2}, 吴 云^{1,2}, 王正宽^{1,2}, 王振中^{1,2}, 肖 伟^{1,2*}

1. 江苏康缘药业股份有限公司, 江苏 连云港 222001

2. 中药制药过程新技术国家重点实验室, 江苏 连云港 222001

摘要:目的 建立双鱼颗粒挥发性成分指纹图谱及定量测定方法。方法 Agilent DB-1 毛细管柱(30 m×0.32 mm, 0.25 μm); 进样量为 1 μL; 分流比为 25:1; 进样口温度为 230 °C; 以氮气为载气, 体积流量 0.6 mL/min; FID 检测器温度为 250 °C; 程序升温。结果 建立的指纹图谱分离度和重复性良好, 确定 12 个共有峰, 各批次样品相似度在 0.95 以上; 采用 GC/MS 对色谱峰进行定性分析, 其中 7 个成分经对照品比对, 分别为桉油精(峰 2)、樟脑(峰 3)、薄荷酮(峰 4)、龙脑(峰 5)、薄荷脑(峰 6)、(+)-胡薄荷酮(峰 9)、甲基正壬酮(峰 10), 其中 1、10、11、12 号峰主要来自于鱼腥草, 2、5 号峰主要来自于艾叶和薄荷, 3 号峰主要来自于艾叶, 4、6、8、9 号峰主要来自于薄荷, 7 号峰主要来自于艾叶、薄荷和鱼腥草。并对其中桉油精、薄荷脑进行定量分析, 平均回收率分别为 103.9%和 98.2%, RSD 分别为 2.1%和 2.3%。10 批次样品中桉油精为 0.17~0.23 mg/g, 薄荷脑为 0.45~0.67 mg/g。结论 建立的双鱼颗粒指纹图谱和 2 个指标成分定量分析方法, 快速、简便、准确, 能有效评价该制剂的质量。

关键词: 双鱼颗粒; 挥发性成分; 气相色谱; 指纹图谱; 相似度; GC-MS; 桉油精; 樟脑; 薄荷酮; 龙脑; 薄荷脑; 胡薄荷酮; 甲基正壬酮

中图分类号: R286.02

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2019)09-2081-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.09.011

Establishment and application of fingerprint and quantitative method of volatile components in Shuangyu Granules

LIN Xia^{1,2}, CUI Pei-chao^{1,2}, WANG Xue^{1,2}, HU Han-fei^{1,2}, WU Yun^{1,2}, WANG Zheng-kuan^{1,2}, WANG Zhen-zhong^{1,2}, XIAO Wei^{1,2}

1. Jiangsu Kanion Pharmaceutical Co., Ltd., Lianyungang 222001, China

2. State Key Laboratory of New-tech for Chinese Medicine Pharmaceutical Process, Lianyungang 222001, China

Abstract: Objective To establish the GC fingerprint and components quantitative determination of Shuangyu Granules (SG) for quality control. **Methods** Agilent DB-1 capillary column (30 m × 0.32 mm, 0.25 μm) was used with upper column volume of 1 μL and split ratio of 25:1; Injection port was 230 °C and detector temperatures was 250 °C; The carrier gas was nitrogen and its flow rate was 0.6 mL/min. The column temperature was raised by program. **Results** The fingerprints with good separation and repeatability included 12 mutual common peaks, and the similarity of each batch was more than 0.95. Seven chemical components were identified by GC/MS and standard compounds, which were eucalyptol (peak 2), camphor (peak 3), menthone (peak 4), borneol (peak 5), menthol (peak 6), pulegone (peak 9), and undecanone (peak 10); Among which, peaks of 1, and 10—12 were from *Houttuyniae Herba*, peaks of 2 and 5 from *Artemisiae Argyi Folium* and *Menthae Haplocalycis Herba*, peak of 3 from *Artemisiae Argyi Folium*, peak of 4, 6, 8 and 9 from *Menthae Haplocalycis Herba*, peak of 7 from *Menthae Haplocalycis Herba*, *Artemisiae Argyi Folium* and *Houttuyniae Herba*. Moreover, eucalyptol and menthol were quantified and the average recovery rates of eucalyptol and menthol were 103.9% and 98.2% (RSD were 2.1% and 2.3%), respectively. The content of eucalyptol and menthol in 10 batches samples were 0.17—0.23 mg/g and 0.45—0.67 mg/g, respectively. **Conclusion** The method of fingerprint and quantitative analysis of two components in SG was rapid, simple, and accurate, which could be used for the quality control of SG.

收稿日期: 2019-01-26

基金项目: 国家“重大新药创制”科技专项(2017ZX09301034); 江苏省“六大人才高峰”计划(P003)

作者简介: 林 夏(1985—), 女, 硕士, 中级工程师, 从事中药质量标准研究。Tel: (0518)85521932 E-mail: linxia297125856@163.com

*通信作者 肖 伟, 研究员, 研究方向为中药制剂和创新中药的开发与研究。

Tel: (025)87181851 Fax: (0518)81152327 E-mail: kanionlunwen@163.com

Key words: Shuangyu Granules; volatile components; gas chromatography; fingerprint; similarity; GC-MS; eucalyptol; camphor; menthone; borneol; menthol; pulegone; undecanone

双鱼颗粒(Shuangyu Granules, SG)处方由鱼腥草、金银花、赤芍、艾叶和薄荷5味药组成,其中金银花为君药,鱼腥草、赤芍为臣药,艾叶为使药,薄荷为佐药,诸药配伍共奏辛凉解表、清热解毒之功效,用于外感风热所致的感冒。症见发热头痛、全身酸痛、鼻塞、流涕、咳嗽、咳痰、咽喉发痒、口干而渴、咽喉红肿疼痛、舌红、脉数等症^[1]。

文献资料表明,艾叶挥发油具有平喘、镇咳、消炎、抑菌、抗过敏、护肝利胆、促进消化以及补体激活等作用,桉叶油素、樟脑、龙脑、蒿醇、萜品烯醇、香韦醇和石竹烯都有一定的平喘作用^[2-5];鱼腥草主要成分包括黄酮类化合物、脂肪酸、挥发油和生物碱等,其中挥发性成分甲基正壬酮、癸酰乙醛、脂肪酸、脂肪醛酮和各种萜烯、萜醇等为其主要药效成分^[6-9];薄荷中主要的挥发性化学成分为醇、酮、烯及酯类,其中薄荷油中薄荷脑为其主要化学成分^[10-11]。在已有酚酸类及单萜苷类成分定量控制方法^[12]的基础上,为了更好地控制产品质量,保证临床疗效和产品批间一致性,有必要对双鱼颗粒中挥发性成分进行质量控制。本实验拟采用GC-MS^[13-22]对挥发性成分进行定性分析,建立双鱼颗粒挥发性成分GC指纹图谱,并对主要药效成分桉油精及薄荷脑进行含量测定,为双鱼颗粒质量标准研究提供参考。

1 材料与试药

Agilent 7890A 型气相色谱仪, FID 检测器; Agilent 7890A-型气质色谱仪, Millipore Milli-Q Century 纯水仪, 美国 Millipore 公司; BSA224S-CW 型电子分析天平, 德国 Sartorius 公司; Mettler Toledo X6 型电子分析天平, 瑞士 Mettler 公司。

对照品桉油精(批号 110788-201506, 质量分数 98.4%)、薄荷脑(批号 110728-200506, 质量分数 100%)、甲基正壬酮(批号 110834-200502, 质量分数 100%)、(-)-薄荷酮(批号 111705-201105, 质量分数 99.8%)、龙脑(批号 110881-201107, 质量分数 99.3%)、胡薄荷酮(批号 111706-201205, 质量分数 99.8%)、樟脑(批号 110747-201409, 质量分数 98.7%)均购自中国食品药品检定研究院, 含量测定用; 水为超纯水; 其余试剂均为分析纯。双鱼颗粒, 批号为 161201、170601、170602、170603、

180201、180202、180203、180901、180902、180903, 分别编号为 S1~S10, 江苏康缘药业股份有限公司制备。

实验用药材金银花 *Lonicerae Japonicae Flos*、鱼腥草 *Houttuyniae Herba*、赤芍 *Paeoniae Radix Rubra*、薄荷 *Menthae Haplocalycis Herba*、艾叶 *Artemisiae Argyi Folium* 均购自连云港康济大药房, 并由连云港康济大药房连锁有限公司吴舟执业药师鉴定, 依次为忍冬科植物忍冬 *Lonicera japonica* Thunb. 的干燥花蕾或带初开的花、二白草科植物蕞菜 *Houttuynia cordata* Thunb. 的干燥地上部分、毛茛科植物芍药 *Paeonia lactiflora* Pall 的干燥根、唇形科植物薄荷 *Mentha haplocalyx* Briq. 的干燥地上部分、菊科植物艾 *Artemisiae argyi* Lévl. et Vant. 的干燥叶。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

毛细管柱为 Agilent DB-1(30 m×0.32 mm, 0.25 μm), 采用升温程序为柱温 80 °C 保持 2 min, 再以 8 °C/min 升至 112 °C, 保持 4 min, 再以 2 °C/min 升至 120 °C, 保持 6 min, 再以 20 °C/min 升至 250 °C; 进样量 1 μL; 分流比 25:1; 进样口温度 230 °C; FID 检测器温度为 250 °C; 氮气体积流量 0.6 mL/min。

2.2 参照物选择及参照物溶液的制备

选择保留时间适中、分离度良好的薄荷脑作为参照物。取薄荷脑对照品适量, 加正己烷制得含薄荷脑 200 μg/mL 的参照物溶液。

2.3 供试品溶液的制备

取装量差异项下的本品, 混匀, 取适量, 研细, 取约 10.0 g, 精密称定, 置 500 mL 烧瓶中, 加入玻璃珠数颗, 自挥发油提取器上端加入水 250 mL, 再加入正己烷 3 mL。自沸腾开始计时 60 min, 停止加热, 静置 30 min 后, 分取正己烷层, 挥发油提取器用正己烷涮洗 2 次, 合并正己烷于 25 mL 量瓶内, 加正己烷稀释定容至刻度, 摇匀, 过 0.22 μm 微孔滤膜, 取续滤液, 作为供试品溶液。

2.4 精密度试验

取同一供试品(批号 161201)溶液连续进样 6 针, 以薄荷脑为参照峰, 计算共有峰相对保留时间

及主要共有峰相对峰面积, 结果 RSD 均小于 1.0%。又以第 1 次进样所得指纹图谱作为参照, 计算后 5 次进样所得指纹图谱的相似度, 结果相似度均不小于 0.99。

2.5 稳定性试验

取同一供试品(批号 161201)内容物适量, 取约 10.0 g, 精密称定, 按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 精密吸取 1 μ L, 分别于 0、3、6、9、12、18 h 注入气相色谱仪。以薄荷脑为参照峰, 计算共有峰相对保留时间及主要色谱峰相对峰面积, 结果 RSD 均小于 0.8%。又以第 1 次进样所得指纹图谱作为参照计算后 5 次进样所得指纹图谱的相似度, 结果相似度均不小于 0.99。

2.6 重复性试验

取同一供试品(批号 161201)内容物适量, 取约 10.0 g, 精密称定, 按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 平行制备 6 份, 测定。以薄荷脑为参照峰, 计算共有峰相对保留时间及主要色谱峰相对峰面积, 结果 RSD 均小于 1.5%。又以第 1 次进样所得指纹图谱作为参照计算后 5 次进样所得指纹图谱的相似度, 结果相似度均不小于 0.99。

2.7 指纹图谱研究

2.7.1 指纹图谱的建立及技术参数 分别取 10 批不同批号的双鱼颗粒, 按供试品的制备方法制备, 分别测定。将 10 批双鱼颗粒指纹图谱导入《中药色

谱指纹图谱相似度评价系统》2012 年版进行分析, 以平均数法建立对照指纹图谱(R)。10 批样品(S1~S10)的指纹图谱与 R 比较, 谱图见图 1。

2.7.2 指纹图谱共有峰归属 分别取处方各药味粉末 2 g, 精密称定, 按照“2.3”项下方法制备供试品溶液, 按照“2.1”项下色谱条件进样分析, 结果 1、10、11、12 号峰主要来自于鱼腥草, 2、5 号峰主要来自于艾叶和薄荷, 3 号峰主要来自于艾叶, 4、6、8、9 号峰主要来自于薄荷, 7 号峰主要来自于艾叶、薄荷和鱼腥草。结果见图 2。

2.7.3 指纹图谱中色谱峰指认 取桉油精、樟脑、龙脑、薄荷脑、甲基正壬酮、薄荷酮、胡薄荷酮对照品适量, 分别加正己烷制成 20 μ g/mL 对照品溶液, 同时取“2.3”项下供试品溶液, 采用 GC/MS 对指纹峰进行指认, GC 条件除载气为氦气外其余同“2.1”项下; MS 条件: 离子源温度 260 $^{\circ}$ C; 溶剂延迟时间 4.5 min; 离子源电压 -70 eV; MS 全扫描模式; 分子量范围 10~550。根据 NIST 系统质谱图库检索匹配及对照品确认结构, 确定指纹图谱中 7 个特征峰化学成分及结构, 见表 1。

2.8 桉油精、薄荷脑的含量测定

2.8.1 色谱条件 同“2.1”项下色谱条件。色谱图见图 3。

2.8.2 混合对照品溶液的制备 取桉油精、薄荷脑对照品溶液适量, 精密称定, 加正己烷制成含桉油

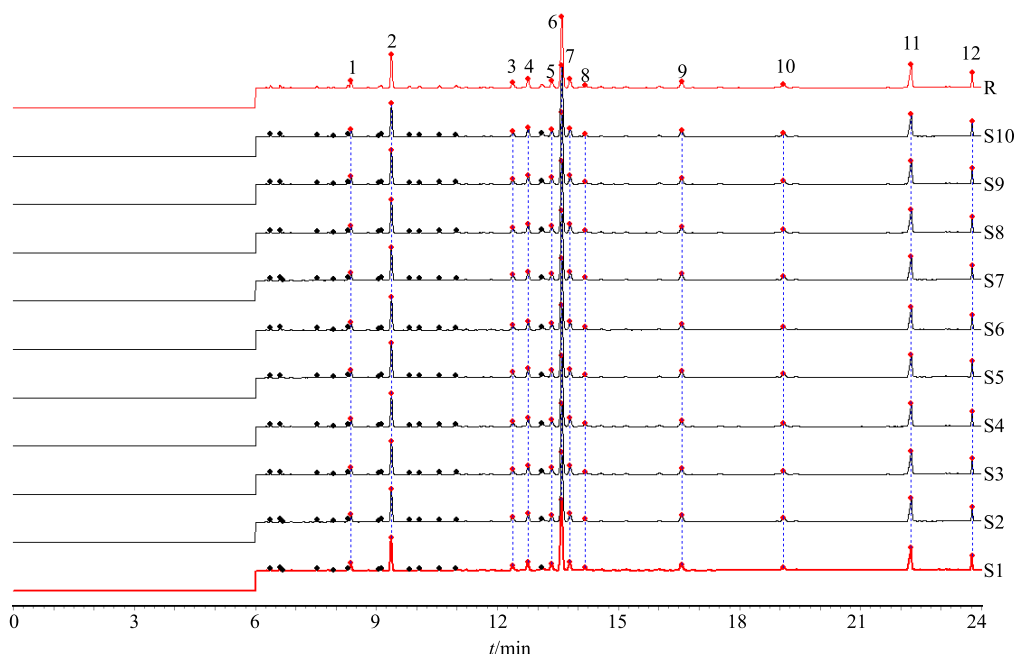


图 1 10 批双鱼颗粒指纹图谱
Fig. 1 Fingerprints of ten batches of SG

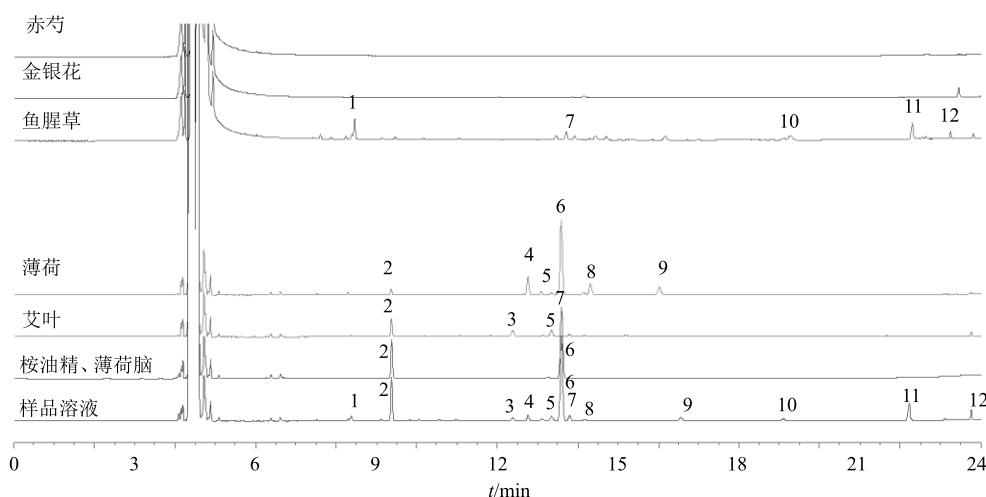


图 2 双鱼颗粒指纹图谱共有峰归属

Fig. 2 Fingerprint assignments of characteristic peaks of SG

表 1 共有峰指认结果

Table 1 Ingredients in common peaks of SG

峰号	化合物	分子式	相对分子质量	来源
2	桉油精	C ₁₀ H ₁₈ O	154	艾叶/薄荷
3	樟脑	C ₁₀ H ₁₆ O	152	艾叶
4	薄荷酮	C ₁₀ H ₁₈ O	154	薄荷
5	龙脑	C ₁₀ H ₁₈ O	154	艾叶
6	薄荷脑	C ₁₀ H ₂₀ O	156	薄荷
9	(+)-胡薄荷酮	C ₁₀ H ₁₆ O	152	薄荷
10	甲基正壬酮	C ₁₁ H ₂₂ O	170	鱼腥草

精、薄荷脑分别为 830.50、2 099.52 $\mu\text{g/mL}$ 的混合对照品母液和含桉油精、薄荷脑分别为 815.93、2 084.40 $\mu\text{g/mL}$ 的混合对照品母液，取混合对照品母液 1 mL 置 10 mL 量瓶内，加正己烷稀释定容至刻度摇匀即得混合对照品溶液。

2.8.3 供试品溶液的制备 同“2.3”项供试品溶液的制备方法。

2.8.4 线性关系的考察 取“2.8.2”项下混合对照品母液，精密量取 0.1、0.2、0.5、1.0、1.5、2.0 mL 分别于 5 mL 量瓶内，加入正己烷稀释定容至刻度，摇匀即得含桉油精 16.32、32.64、81.59、163.19、244.78、326.37 $\mu\text{g/mL}$ ，含薄荷脑 41.69、83.38、208.44、416.88、625.32、833.76 $\mu\text{g/mL}$ 的混合对照品。分别吸取上述溶液 1 μL ，注入气相色谱仪，测定，以峰面积平均值为纵坐标 (Y)，对照品质量浓度为横坐标 (X)，绘制标准曲线，得回归方程分别为桉油精 $Y=0.7185X+1.0899$ ， $r=0.9999$ ；薄荷脑 $Y=0.7234X+2.6501$ ， $r=0.9999$ 。结果桉油精在质量浓度为 16.32~326.37 $\mu\text{g/mL}$ 呈良好的线性关

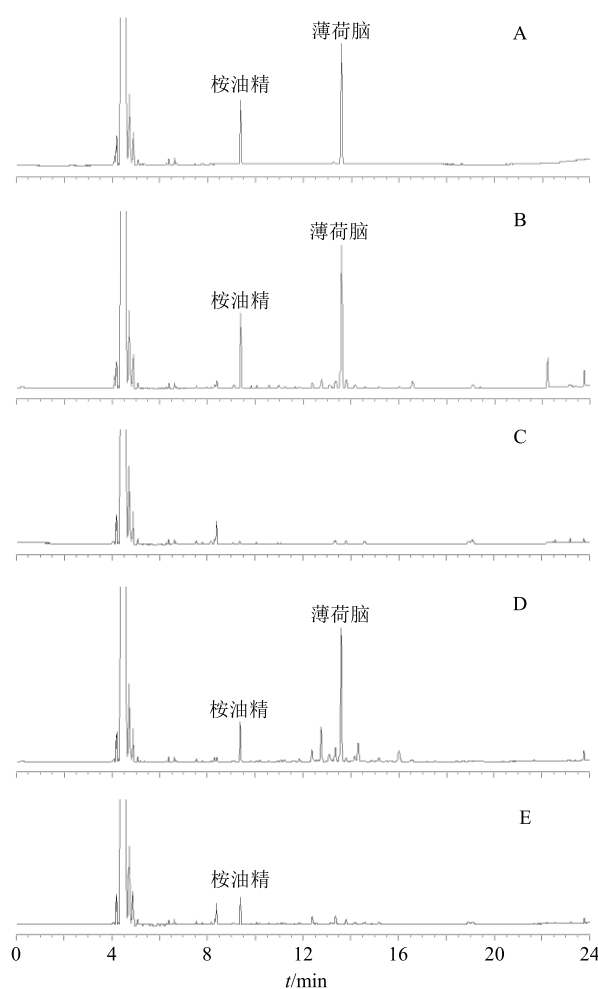


图 3 混合对照品 (A)、双鱼颗粒样品 (B)、缺艾叶和薄荷阴性 (C)、缺艾叶阴性 (D)、缺薄荷阴性 (E) 的 GC 图

Fig. 3 GC of mixed reference substances (A), SG sample (B), sample without *Artemisiae Argyi Folium* and *Menthae Haplocalycis Herba* (C), sample without *Artemisiae Argyi Folium* (D), sample without *Menthae Haplocalycis Herba* (E)

系,薄荷脑在质量浓度为 41.69~833.76 $\mu\text{g/mL}$ 呈良好的线性关系。

2.8.5 精密度试验 取低、中、高 3 个不同质量浓度的混合对照溶液,桉油精质量浓度依次为 16.32、81.59、326.37 $\mu\text{g/mL}$,薄荷脑质量浓度依次为 41.69、208.44、833.76 $\mu\text{g/mL}$ 分别连续进样 6 次,其峰面积 RSD 均小于 2%,结果表明,仪器精密度良好。

2.8.6 稳定性试验 取同一供试品(批号 161201)溶液分别于 0、2、4、8、12 h 进样,供试品溶液中桉油精、薄荷脑峰面积的 RSD 分别为 1.6%、1.5%,表明供试品溶液在 12 h 内稳定。

2.8.7 重复性试验 取本品(批号 161201),按供试品溶液制备方法制得 6 份供试品溶液,依法测定,结果桉油精、薄荷脑质量分数分别为 0.219、0.609 mg/g, RSD 分别为 1.68%、0.90%。

2.8.8 加样回收率试验 取装量差异项下的本品(批号 161201,含桉油精 0.219 mg/g,薄荷脑 0.609 mg/g),混匀,取适量,研细,分别称取 6 份,每份约 10 g,精密称定,置 500 mL 烧瓶中,分别精密加入混合对照品母液 1.5 mL,待混合对照品溶液与供试品充分混合后,加入玻璃珠数颗,自挥发油提取器上端加入水 250 mL,再加正己烷 3 mL,密闭连接好冷凝管后,自沸腾开始计时 90 min,待冷却后分取正己烷层,挥发油提取器用正己烷涮洗 2 次,合并正己烷于 25 mL 量瓶内,加正己烷稀释定容至刻度,摇匀,过 0.22 μm 微孔滤膜,取续滤液,作为供试品溶液。进样测定,结果桉油精、薄荷脑的加样回收率分别为 103.9%和 98.2%, RSD 分别为 2.07%和 2.26%。结果表明,该方法回收率良好。

2.8.9 样品测定结果 取 10 批双鱼颗粒,按“2.3”项下方法制备供试品溶液,并按“2.1”项下色谱条件进样分析,分别计算相似度和 2 种成分的含量,结果见表 2。结果表明,多批次样品中挥发性成分指纹图谱相似度较高,批间具有良好的一致性。多批次样品中桉油精与薄荷脑的含量 RSD 较大,与制剂中桉油精与薄荷脑含量较低有关,同时也受艾叶与薄荷药材中桉油精和薄荷脑含量差异的影响。

3 讨论

考察了 3 种升温程序方式,优选出最佳升温程序,对氮气流速、初始温度、分流比、进样量、不同批号色谱柱进行了考察,结果耐用性良好。

考察了水蒸气提取、乙醇提取、二氯甲烷 3 种提取方法,由于水蒸气提取方法所提取样品无色透

表 2 10 批双鱼颗粒指纹图谱相似度及含量测定结果
Table 2 Similarity and content determination results of 10 batches of SG

批号	桉油精/(mg·g ⁻¹)	薄荷脑/(mg·g ⁻¹)	相似度
161201	0.23	0.67	0.978
170601	0.21	0.47	0.954
170602	0.22	0.45	0.966
170603	0.22	0.47	0.951
180201	0.20	0.55	0.987
180202	0.19	0.54	0.967
180203	0.20	0.57	0.987
180901	0.17	0.60	0.956
180902	0.18	0.62	0.964
180903	0.18	0.62	0.969
平均值	0.20	0.56	0.960
RSD/%	10.00	13.36	1.89

明,指纹峰个数较多且桉油精、薄荷脑提取率最佳,故选择水蒸气提取方法。并考察了 30、60、90、120 min 提取时间对指纹图谱和含量结果的影响,结果表明 90 min 可以提取完全。

考察了 Agilent DB-1 和 MEGA-1 毛细管色谱柱,均具有良好的重现性和分离度,可用于本品含量测定和指纹分析。

本方法建立的双鱼颗粒挥发性成分指纹图谱及含量测定方法,对 12 个共有峰进行了归属,对 7 个共有峰进行了定性,并对其中 2 个成分进行了定量分析,能够较好地双鱼颗粒质量进行控制,但是其他 5 个共有峰的定性分析还需要进一步研究。

参考文献

- [1] 王俨如,张新庄,李娜,等.基于网络药理学方法探讨双鱼颗粒治疗上呼吸道感染的作用机制[J].中国新药杂志,2015,24(11):1222-1227.
- [2] 阴健,郭力弓.中药现代化研究与临床应用[M].北京:学苑出版社,1995.
- [3] 欧明,林励,李衍文.简明中药成分手册[M].北京:中国医药科技出版社,2003.
- [4] 刘国声.艾叶挥发油成分的研究[J].中草药,1990,21(9):8-9.
- [5] 魏国会,杜梅素,宋宁,等.艾叶油的平喘作用研究——小鼠卵蛋白复制法[J].时珍国医国药,2010,21(1):86-87.
- [6] 刘永隆,邓志芳.鱼腥草挥发油化学成分的研究[J].植物学报,1979,21(3):244.

- [7] 杨 滨, 王若普, 王谦朋, 等. 鱼腥草中挥发油成分的气相色谱指纹图谱研究 [J]. 中国中药杂志, 2006, 31(24): 2055-2057.
- [8] 李 爽, 于庆海, 金佩珂. 鱼腥草的有效成分、药理作用及临床应用的研究进展 [J]. 沈阳药科大学学报, 1997, 14(2): 144-146.
- [9] 王利勤, 赵友兴, 周 露, 等. 鱼腥草的化学成分研究 [J]. 中草药, 2007, 38(12): 1788-1790.
- [10] 徐凌玉, 李振麟, 蔡芷辰, 等. 薄荷化学成分的研究 [J]. 中草药, 2013, 44(20): 2798-2802.
- [11] 李 祥, 邢文峰. 薄荷的化学成分及临床应用研究进展 [J]. 中南药学, 2011, 9(5): 362-365.
- [12] 秦建平, 郎 悦, 李家春, 等. 基于指纹图谱分析和多成分同时定量的双鱼颗粒质量评价研究 [J]. 中草药, 2016, 47(19): 3426-3431.
- [13] Huang L F, Wang Z H, Chen S L. GC-MS analysis on volatile oil from branches of *Picrasma quassioides* [J]. *Chin Herb Med*, 2013, 5(1): 73-76.
- [14] 刘向前, 张晓丹, 郑礼胜, 等. 黄水枝不同部位挥发性成分的GC-MS研究 [J]. 现代药物与临床, 2010, 25(1): 31-35.
- [15] 靳 然, 赵百孝. 气相色谱指纹图谱在中药分析及质量评价中的应用 [J]. 现代科学仪器, 2010(1): 122-123.
- [16] 廖 强, 孙良广, 韦日伟, 等. GC-MS/MS 自动解卷积和多离子反应监测技术在沉香化气片中挥发性成分定性及定量中的应用 [J]. 中草药, 2018, 49(17): 4009-4013.
- [17] 魏 刚. 曾经考. 黄月纯. GC-MS在中药复方制剂挥发油研究中的应用分析 [J]. 中药新药与临床药理, 2000, 11(5): 297-298.
- [18] 靳 然, 于密密, 赵百孝, 等. 气相色谱法测定艾叶 4 个挥发性成分的含量 [J]. 药物分析杂志, 2013, 33(6): 1033-1036.
- [19] 陈在敏. 薄荷素油特征图谱的研究及多组分含量测定 [J]. 药物分析杂志, 2011, 31(10): 1957-1960.
- [20] 王 淳, 宋志前, 宁张弛, 等. 黄精炮制二氯甲烷组分 Maillard 反应产物及抗氧化活性研究 [J]. 中草药, 2019, 50(3): 604-610.
- [21] 王 健, 孙 瑜, 陈双璐, 等. 柠檬挥发油成分的气相色谱-质谱分析 [J]. 现代药物与临床, 2013, 28(6): 830-831.
- [22] Li J, Tian Y Z, Sun B Y, et al. Analysis on volatile constituents in leaves and fruits of *Ficus carica* by GC-MS [J]. *Chin Herb Med*, 2012, 4(1): 63-69.