

GC 法测定银翘解毒系列制剂中薄荷脑、薄荷酮和胡薄荷酮

霍丽霞¹, 鲁寅生², 郭青^{2*}, 余伯阳¹

1. 中国药科大学, 江苏 南京 210038

2. 江苏省食品药品监督检验院, 江苏 南京 210008

摘要: 目的 为银翘解毒系列制剂研究制定统一通用的薄荷与荆芥的质量控制方法。方法 以薄荷酮、薄荷脑和胡薄荷酮为指标, 采用 HP-5 毛细管柱 (30 m×0.32 mm, 0.25 μm), 50~240 ℃程序升温进行分析, 并测定了 5 种剂型 9 个品种共 38 批样品中 3 个成分的量。结果 薄荷酮、薄荷脑、胡薄荷酮 3 种成分在 5 个剂型中重复性 RSD ($n=5$) 为 0.52%~1.95%; 加样回收率分别为 96.29%~102.83%、97.55%~99.96%、95.36%~103.51%。结论 本实验建立的方法重复性好, 准确度高, 适用于银翘解毒全部系列品种中薄荷酮、薄荷脑和胡薄荷酮 3 种挥发性成分的质量控制。

关键词: 银翘解毒系列制剂; 气相色谱; 薄荷酮; 薄荷脑; 胡薄荷酮

中图分类号: R917.4 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2015) 01-0066-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2015.01.013

Determination of menthone, menthol, and pulegone in Yinqiao Jiedu serial products by GC method

HUO Li-xia¹, LU Yin-sheng², GUO Qing², YU Bo-yang¹

1. China Pharmaceutical University, Nanjing 210038, China

2. Jiangsu Institute of Food and Drug Control, Nanjing 210008, China

Abstract: **Objective** To develop a universal and common used method on quality control of *Menthae Haplocalycis Herba* and *Schizonepetae Herba* in all preparations of Yinqiao Jiedu serial products. **Methods** The samples were analyzed on HP-5 column (30 m × 0.32 mm, 0.25 μm) with temperature programmed from 50 ℃ to 240 ℃ using menthone, menthol, and pulegone as markers. The methodology validation was made and determination was carried out with 38 batches of samples of five different preparations of Yinqiao Jiedu products. **Results** The RSD ($n = 5$) of repeatabilities of three components were 0.52% to 1.95%; The average recoveries of menthone, menthol, and pulegone were 96.29%—102.83%, 97.55%—99.96%, and 95.36%—103.51%, respectively. **Conclusion** The method developed was in good repeatability and accuracy, and it can be applied in quality control on volatile constituents in all preparations of Yinqiao Jiedu serial products.

Key words: Yinqiao Jiedu serial products; GC; menthone; menthol; pulegone

银翘解毒系列制剂具有疏风解表, 清热解毒的功效^[1]。临床上用于风热感冒, 症见发热头痛、咳嗽口干、咽喉疼痛。由 9 味药组成, 其中连翘、金银花重用为君, 薄荷、牛蒡子、荆芥穗、淡豆豉辛散透表为臣, 淡竹叶、桔梗为佐, 甘草属佐使之品^[4]。其剂型有丸剂 (大蜜丸、浓缩蜜丸、浓缩水丸)、颗粒剂 (蔗糖型、乳糖型、蛋白糖型)、胶囊剂 (硬胶囊、软胶囊)、合剂 (银翘解毒合剂、银翘解毒液)、片剂 (薄膜衣片、素片) 共 5 个剂型 9 个品种, 其制备工艺中薄荷和荆芥先提取挥发油最后喷加到制

成的颗粒上。银翘解毒系列制剂剂型全, 品种多, 临床用药范围广, 但质量标准中对薄荷和荆芥的控制项目较杂乱。在现行标准中, 软胶囊采用气相色谱法鉴别薄荷脑, 薄层法鉴别荆芥; 银翘解毒液采用化学反应法鉴别薄荷和荆芥; 浓缩水丸对薄荷没有控制; 其他品种均采用薄层色谱法鉴别薄荷脑和荆芥^[1-3]。此外, 薄层色谱法检测灵敏度较低, 会出现挥发性成分量较低时致检不出斑点而产生误判的结果。故其质量控制标准存在方法及指标不统一以及检测结果不准确的问题。因此, 有必要研究建立

收稿日期: 2014-08-27

基金项目: 2015 版《中国药典》立项课题

*通信作者 郭青, 主任药师, 博士, 研究方向为中药质量标准及安全性。Tel:(025)86632807 E-mail:guoqing850@yahoo.cn

适用于银翘解毒所有剂型和品种的合理有效的定性和定量检测方法,统一并完善现行标准中薄荷和荆芥检测项目并使之通用。

1 材料

1.1 仪器

Agilent 6890N 气相色谱仪, FID 检测器, 配 GC solution 色谱工作站; CPA224S 万分之一电子天平(德国 Sartorius 公司); MX5 十万分之一电子天平(瑞士 Mettler-Toledo 公司); JL—720DT 超声

波清洗器(上海杰理超声仪器有限公司); 振荡仪(ZHWY—110X30)。

1.2 试药

对照品薄荷酮(批号 111706-201205)、薄荷脑(批号 110728-200506)、胡薄荷酮(批号 1076-201205)均购自中国食品药品检定研究院,质量分数均为 99.8%。处方中投料用各饮片均由北京同仁堂科技发展股份有限公司提供。其余溶剂均为分析纯。样品信息见表 1。

表 1 样品信息

Table 1 Information of samples

样品	剂型	生产企业	样品批号	样品	剂型	生产企业	样品批号
A ₁	素片	昆明中药	121159	B ₁	颗粒	中山市恒生药业	20121006
A ₂	素片	云南腾药制药	110202	B ₂	颗粒	广东益和堂制药	MK002
A ₃	素片	河南省宛西制药	120101	B ₃	颗粒	西安天一	121104
A ₄	素片	湖北广仁药业	121006	B ₄	颗粒	国药药材冷水江制药	20121104
A ₅	薄膜衣片	吉泰安(四川)药业	1108001	B ₅	颗粒	四川同人泰药业	121107
A ₆	薄膜衣片	北京同仁堂	12120752	B ₆	颗粒	四川泰华堂制药	120601
A ₇	薄膜衣片	江西九连山药业	20121008	B ₇	颗粒	陕西必康制药	12101501
A ₈	薄膜衣片	合肥华润神鹿药业	1206318	B ₈	颗粒	广东在田药业	121101
C ₁	大蜜丸	天津中新药业	4220023	D ₁	合剂	北京同仁堂	12260484
C ₂	大蜜丸	九芝堂	201011003	D ₂	合剂	江西南昌济生制药	120928
C ₃	大蜜丸	山西华康药业	20121001	D ₃	合剂	宝鸡必康嘉隆制药	20121126
C ₄	大蜜丸	西安正大制药	121111-1	D ₄	合剂	北京长城制药	12040101
C ₅	大蜜丸	甘肃天水岐黄药业	101214	D ₅	口服液	广东华南药业	121008
C ₆	大蜜丸	广东百利制药	120803	D ₆	口服液	吉林省康福药业	20120601
C ₇	大蜜丸	山西万辉制药	121108	D ₇	口服液	太极集团四川天诚制药	12040001
C ₈	大蜜丸	佛山冯了性药业	120034	D ₈	口服液	河南省新四方制药	121104
C ₉	浓缩蜜丸	九芝堂	20110803	F ₁	软胶囊	江苏康缘药业	20120303
C ₁₀	水蜜丸	北京同仁堂	12030720	F ₂	软胶囊	江苏康缘药业	20120901
E	硬胶囊	东莞广发制药	20120603	F ₃	软胶囊	江苏康缘药业	20120307

2 色谱条件^[5-6]

Agilent HP-5 毛细管柱(30 m × 0.32 mm, 0.25 μm); FID 检测器; 进样口温度为 200 °C; 检测器温度为 250 °C; 柱温: 初始温度为 50 °C, 保持 1 min; 以 15 °C/min 的速率升温至 100 °C, 保持 10 min; 以 8 °C/min 的速率升温至 150 °C, 保持 2 min; 以 10 °C/min 的速率升温至 240 °C, 保持 10 min。进样量为 1 μL; 载气为氮气; 体积流量 1.5 mL/min; 分流进样, 分流比为 3:1。

3 供试品溶液制备方法的考察

3.1 片剂、颗粒剂、硬胶囊、软胶囊供试品溶液

3.1.1 提取方法比较 精密称取片剂、硬胶囊剂各 2 g、软胶囊剂 1 g、颗粒剂 4.8 g, 加醋酸乙酯 10 mL 分别超声 30 min、振荡 30 min、水蒸汽蒸馏法提取 3 h, 测定。结果片剂和软胶囊剂超声法提取较好; 颗粒剂、硬胶囊剂水蒸汽蒸馏法提取较好。

3.1.2 提取溶剂考察 精密称取片剂、软胶囊适量, 分别加醋酸乙酯和正己烷各 10 mL, 超声 30 min, 结果醋酸乙酯提取效率较高。

3.1.3 提取时间考察 精密称取片剂、软胶囊适量, 加醋酸乙酯 10 mL, 分别超声 15、30、45 min, 结果超声 30 min 可提取完全。

3.1.4 提取溶剂量考察 精密称取片剂、软胶囊适量, 分别加醋酸乙酯 10、20 mL, 超声 30 min, 结果醋酸乙酯 10 mL 可提取完全。

3.2 丸剂、颗粒剂、硬胶囊剂供试品溶液制备

精密称取丸剂 18 g、颗粒剂 12 g、硬胶囊剂 5 g, 分别挥发油提取 2、3、4 h, 并定容至 25 mL, 结果 3 h 可提取完全。

3.3 合剂供试品溶液制备

3.3.1 提取方法比较 精密量取合剂液 10 mL, 分别用醋酸乙酯萃取 3 次(每次 20 mL)、水蒸气蒸馏法提取 3 h, 并定容至 25 mL, 结果醋酸乙酯萃取即可提取完全。

3.3.2 萃取次数考察 精密量取合剂 10 mL, 分别加醋酸乙酯萃取 1、2、3、4、5 次, 每次 20 mL, 合并醋酸乙酯层, 加 10 mL 氨试液洗涤, 弃去氨试液, 分取醋酸乙酯层, 过无水硫酸钠, 定容至 25 mL, 结果醋酸乙酯萃取 3 次即可。

4 溶液的制备

4.1 混合对照品溶液制备

取薄荷酮、薄荷脑、胡薄荷酮对照品适量, 精密称定, 加醋酸乙酯制成各含 1 mg/mL 的混合对照品储备液。

4.2 对照药材溶液制备

取薄荷、荆芥对照药材 1 g, 分别按丸剂供试品溶液制备方法制成对照药材溶液。

4.3 阴性样品溶液制备

参照银翘解毒片现行标准中制法制成缺薄荷和荆芥的双阴性样品, 按丸剂供试品溶液制备方法制成阴性样品溶液。

4.4 供试品溶液制备

分别取片剂、软胶囊剂、丸剂、颗粒剂、硬胶囊剂、合剂适量, 精密称定或量取, 按照供试品溶液制备方法项下最优方法进行提取制备。

5 方法学考察

5.1 专属性实验

取阴性样品溶液进样, 依法测定, 结果见图 1,

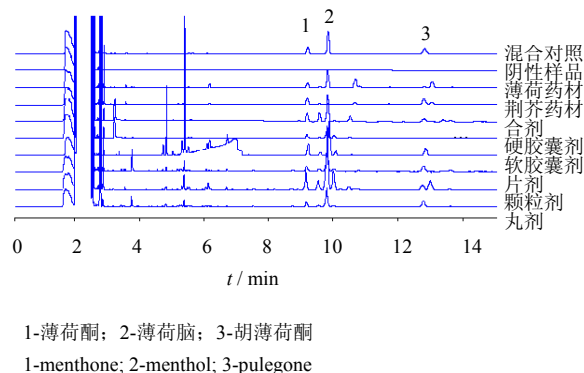


图 1 混合对照品、阴性样品、薄荷对照药材、荆芥对照药材及 6 个不同剂型样品的气相色谱图

Fig. 1 GC of mixed standards, negative sample, *Menthae Haplocalycis Herba*, *Schizonepetae Herba*, and samples of six different preparations

阴性样品色谱图中未出现 3 个指标成分, 表明阴性无干扰。

5.2 标准曲线、定量限与检测限

分别精密吸取混合对照品储备液适量, 加醋酸乙酯配成质量浓度分别为 0.002~0.2 mg/mL 的梯度混合对照品溶液。以质量浓度 (mg·mL⁻¹) 为横坐标, 峰面积为纵坐标进行线性回归, 得回归方程、相关系数及线性范围; 以各化合物的信噪比约等于 10 和 3 时的相应浓度确定定量限 (LOQ) 和检测限 (LOD)。结果见表 2。

5.3 精密度

精密吸取质量浓度为 0.05 mg/mL 的混合对照品溶液, 重复进样 6 次。结果薄荷酮、薄荷脑和胡薄荷酮峰面积的 RSD 值分别为 0.50%、0.62%、0.57%, 表明仪器精密度良好。

5.4 稳定性实验

精密吸取各剂型的供试品溶液, 分别于 0、2、4、8、12、24 h 进样 6 次。结果各剂型薄荷酮、薄荷脑和胡薄荷酮峰面积的 RSD 值为 0.95%~1.68%、0.73%~1.71%、0.82%~1.89%, 表明各剂型的供试品溶液在 24 h 内均稳定。

表 2 薄荷酮、薄荷脑、胡薄荷酮的标准曲线、定量限与检测限

Table 2 Calibration, LOQs, and LODs of menthone, menthol, and pulegone

化合物	回归方程	<i>r</i>	线性范围/(μg·mL ⁻¹)	LOQ/(μg·mL ⁻¹)	LOD/(μg·mL ⁻¹)
薄荷酮	$A=5\,747.2C-1.821\,6$	0.999 9	2.036~203.6	0.500	0.187
薄荷脑	$A=5\,530.2C-1.812\,8$	0.999 9	1.962~196.2	0.625	0.187
胡薄荷酮	$A=4\,057.4C-4.196\,5$	0.999 9	2.094~209.4	1.250	0.313

5.5 重复性试验

按各剂型供试品溶液制备法, 取各剂型样品规定量, 精密称定或量取, 每种剂型平均取样 5 份, 依法制备, 进样, 计算得薄荷酮、薄荷脑及胡薄荷酮的 RSD 值: 在片剂中为 0.99%、1.28%、1.47%, 在软胶囊剂中为 0.87%、0.41%、1.62%, 在颗粒剂中为 1.61%、1.36%、1.59%, 在丸剂中为 1.95%、1.72%、1.74%, 在硬胶囊剂中为 0.72%、0.69%、0.52%, 在合剂中为 1.89%、1.24%、1.28%, 表明方法在各剂型中的重复性良好。

5.6 加样回收率实验

按各剂型供试品溶液制备法, 取各剂型样品规定量的一半, 精密称定或量取, 分别精密加入不同浓度的混合对照品溶液 5 mL, 依法制备, 测定结果见表 3。各剂型回收率为 95.36%~103.5%, RSD 值为 1.1%~2.3% ($n=6$)。见表 3。

6 样品测定

取 33 个企业的 5 个剂型 9 个品种共 38 批银翘解毒系列制剂的样品, 依法制备供试品溶液并测定, 不同剂型银翘解毒制剂样品中薄荷酮、薄荷脑、胡薄荷酮结果见表 4。

表 3 6 种剂型中薄荷、荆芥所含薄荷酮、薄荷脑和胡薄荷酮含量的加样回收率 ($n=6$)

Table 3 Recoveries of menthone, menthol, and pulegone in Yinqiao Jiedu serial products ($n=6$)

剂型	化合物	样品含量/ mg	加入量/ mg	测得量/ mg	平均回 收率/%	RSD /%
片剂	薄荷酮	0.090 3	0.083 2	0.174 7	101.44	1.10
	薄荷脑	1.028 5	1.259 0	2.256 6	97.55	2.33
	胡薄荷酮	0.026 6	0.051 5	0.076 5	96.89	1.79
软胶囊	薄荷酮	0.154 1	0.144 7	0.302 9	102.83	1.36
	薄荷脑	0.401 1	0.324 8	0.719 2	97.94	1.15
	胡薄荷酮	0.080 0	0.071 1	0.147 8	95.36	1.14
颗粒剂	薄荷酮	0.069 7	0.084 9	0.156 5	102.24	1.77
	薄荷脑	0.721 5	0.677 0	1.392 0	99.04	1.93
	胡薄荷酮	0.034 8	0.059 8	0.096 7	103.51	1.44
丸剂	薄荷酮	0.098 1	0.090 1	0.186 0	97.56	1.72
	薄荷脑	0.431 6	0.390 8	0.815 0	98.11	1.62
	胡薄荷酮	0.200 0	0.244 2	0.434 5	96.03	1.42
硬胶囊	薄荷酮	0.103 5	0.109 7	0.209 1	96.29	2.14
	薄荷脑	0.128 3	0.098 7	0.225 4	98.38	2.20
	胡薄荷酮	0.069 2	0.063 1	0.132 4	100.16	1.90
合剂	薄荷酮	0.212 4	0.208 0	0.419 2	99.42	2.15
	薄荷脑	0.770 3	0.708 0	1.478 0	99.96	2.31
	胡薄荷酮	0.116 2	0.157 9	0.274 4	100.19	2.21

表 4 各企业各批次样品中的薄荷酮、薄荷脑和胡薄荷酮

Table 4 Determination of menthone, menthol, and pulegone of different batches and enterprises

样品	剂型	薄荷酮	薄荷脑	胡薄荷酮	样品	剂型	薄荷酮	薄荷脑	胡薄荷酮
A ₁	素片	0.09	—	0.12	B ₁	颗粒	0.05	0.52	0.02
A ₂	素片	ND	ND	ND	B ₂	颗粒	0.04	0.42	0.03
A ₃	素片	—	—	0.03	B ₃	颗粒	0.03	0.18	0.03
A ₄	素片	—	0.99	—	B ₄	颗粒	6.23	26.12	3.77
A ₅	薄膜衣片	0.03	0.02	0.10	B ₅	颗粒	0.01	1.23	0.03
A ₆	薄膜衣片	0.04	0.39	0.11	B ₆	颗粒	0.02	0.10	0.06
A ₇	薄膜衣片	0.42	6.10	0.18	B ₇	颗粒	0.02	0.05	0.02
A ₈	薄膜衣片	0.34	4.89	0.15	B ₈	颗粒	0.03	1.41	0.03
平均值	片剂	0.17	2.23	0.11	平均值	颗粒剂	0.80	3.75	0.50
C ₁	大蜜丸	0.04	—	0.28	D ₁	合剂	0.13	0.07	0.07
C ₂	大蜜丸	0.08	0.06	0.55	D ₂	合剂	0.01	0.30	ND
C ₃	大蜜丸	0.08	0.35	0.10	D ₃	合剂	0.14	0.62	0.06
C ₄	大蜜丸	0.04	0.18	0.08	D ₄	合剂	0.06	0.02	0.08
C ₅	大蜜丸	0.13	0.03	0.24	D ₅	口服液	0.03	0.13	0.03
C ₆	大蜜丸	0.13	0.10	0.22	D ₆	口服液	—	—	—
C ₇	大蜜丸	0.12	0.46	0.30	D ₇	口服液	0.15	0.63	0.06
C ₈	大蜜丸	0.14	15.52	0.38	D ₈	口服液	0.38	1.29	0.29
C ₉	浓缩蜜丸	0.06	0.16	0.21	平均值	液体制剂	0.13	0.44	0.10
C ₁₀	水蜜丸	0.02	0.15	0.05	F ₁	软胶囊	0.11	0.14	0.11
平均值	丸剂	0.08	1.87	0.24	F ₂	软胶囊	0.83	1.53	0.23
E	硬胶囊	0.01	0.01	0.01	F ₃	软胶囊	0.36	0.73	0.19
平均值	硬胶囊剂	0.01	0.01	0.01	平均值	软胶囊剂	0.44	0.80	0.18

“—”表示 $S/N < 10$, “ND”表示未检测到

“—”- $S/N < 10$, “ND”-not detected

7 讨论

7.1 不同剂型的提取方法

本品系列制剂共有9个品种,由于制法、辅料、物理形态的不同,提取方法无法统一,本研究针对这些特点制订了合理的提取方法,为银翘解毒所有剂型统一薄荷和荆芥的定量方法奠定了基础。颗粒剂与硬胶囊的制法和辅料与片剂类似,从理论上应该与片剂的提取方法相同,但两个剂型超声法的提取效率却较低,分析原因是所用辅料在超声时导致结块,使挥发性成分难以溶出,因此颗粒剂和硬胶囊改用水蒸气蒸馏提取。合剂提取后其色谱图在薄荷脑峰处出现杂质峰干扰,曾尝试改用30~60℃石油醚、正己烷,结果两种提取液均出现严重的乳化现象且很难破乳;后仍采用醋酸乙酯萃取,但增加采用碱性较弱的氨试液洗涤,结果能有效去除干扰峰,且对3个所测成分含量基本没有影响。因此合剂选择采用醋酸乙酯萃取后用氨试液洗涤。

7.2 结果分析

通过检测33个企业的38批样品,发现丸剂中3种成分的含量最高,其次是软胶囊,片剂、颗粒剂及合剂之间的含量差异不大,硬胶囊的含量最低。另外发现片剂中不同企业间含量差异较大,37.5%的企业未能检测出薄荷酮和薄荷脑,25%的企业未能检测出胡薄荷酮,其中一个企业3种成分均未检出,但包衣片中每个成分的含量均高于素片。由此可以看出,不同企业及同一企业不同批次的产品中挥发油质量存在很大差异。分析可能存在4点原因:一是药材质量差,挥发油提取率低,或者未提取挥发油进行投料;二是挥发油加工工艺不均匀;三是灭菌工艺有高温环节导致挥发油损失;四是包装材料存在问题导致贮存期间挥发油损失。

7.3 3个指标的专属性

据文献,薄荷中主要的挥发性成分为薄荷脑^[7];荆芥中主要成分为薄荷酮、胡薄荷酮^[6],荆芥及荆芥穗中所含的薄荷酮和胡薄荷酮的含量差别很大^[8]。受产地及采收季节等各种因素影响,3种成分在药材中的含量不同^[9-10]。通过对薄荷叶、茎和荆芥茎、穗中3种成分的测定发现,薄荷中薄荷脑含量较高,

而荆芥中薄荷脑只有微量或检测不出,因此薄荷脑可以作为薄荷的专属性成分;薄荷和荆芥中均含有一定量的薄荷酮和胡薄荷酮,但胡薄荷酮与薄荷脑的比值在薄荷中远低于在荆芥中,这个比值在荆芥茎中又低于在荆芥穗中。所以确定银翘解毒制剂中是否投料薄荷,可采用薄荷脑为指标;是否投料荆芥,仅以薄荷酮、胡薄荷酮为指标还不具专属性,需要规定胡薄荷酮与薄荷脑的比值,而对于投料荆芥穗还是荆芥茎,也可通过这个比值来区分,比值的探索研究正在进行中。

本文的研究以薄荷脑、薄荷酮、胡薄荷酮为指标,对银翘解毒系列制剂的不同剂型制订了不同的提取方法,建立了通用的色谱分析方法,统一了全部剂型对挥发性成分的控制标准,为银翘解毒系列制剂的药典通用标准制定奠定了基础并能准确的评价银翘解毒系列制剂的质量。

参考文献

- [1] 中国药典[S].一部.2010.
- [2] 中药成方制剂[S].第14册.第19册.2010.
- [3] 国家中成药标准汇编[S].2002.
- [4] 赵海平,廖正根,朱根华,等.银翘散类方中成药系统性再评价的探讨[J].中华中医药杂志,2012,27(11):2779-2781.
- [5] 马丽端,于密密,傅欣彤,等.感冒颗粒中的挥发油的提取工艺研究[J].药物分析杂志,2012,32(8):1374-1378.
- [6] 黄华花,吴春敏.维C银翘片挥发性成分GC-MS特征图谱研究[J].药物分析杂志,2011,31(4):768-771.
- [7] Zhao D Y, Xu W, Yang G L, et al. Variation of essential oil of *Mentha haplocalyx* Briq. and *Menthaspicata* L. from China [J]. *Ind Crops Prod*, 2013, (42): 251-260.
- [8] 丁安伟,于生,陈艺文.不同采收期荆芥挥发性成分的含量变化研究[C]//全国第9届天然药物资源学术研讨会.2010:481-487.
- [9] 安秋荣,郭志峰.用GC-MS法分析春、秋季薄荷油成分[J].分析测试学报,2000,19(5):64-66.
- [10] 郭晓恒,万德光,陈美兰,等.不同地区野生薄荷挥发油的比较[J].天然产物研究与开发,2011,23(6):1139-1143.