

养血清脑颗粒中挥发性成分的 GC 指纹图谱研究

李文博^{1,2}, 韩建平², 倪倩^{1,3}, 高钧^{2*}

1. 中国药科大学 药物分析教研室, 江苏 南京 210009

2. 天津天士力集团有限公司, 天津 300402

3. 中国药科大学 中药分析教研室, 江苏 南京 210009

摘要: 目的 采用气相色谱(GC)法建立养血清脑颗粒指纹图谱,并用 GC-MS 法对其中化学成分进行分析鉴定。方法 采用 DB-5MS (30 m×0.25 mm, 1 μm) 石英毛细管色谱柱进行分离,氢火焰离子化检测器检测,进样口温度为 250 ℃,分流比为 50:1;分离过程中采用程序升温方式:以 10 ℃/min 从 150 ℃升至 210 ℃,平衡 5 min,再以 3 ℃/min 升温至 240 ℃,平衡 10 min;载气为高纯氮气,体积流量 1 mL/min,进样量 1 μL。结果 10 批养血清脑颗粒得到的共有指纹图谱选定了 10 个共有峰,通过质谱鉴定出 10 个共有峰的化学成分,并考察了制剂与中间体和药材的相关性。结论 该方法准确、重现性好,可以作为养血清脑颗粒质量评估和控制的依据。

关键词: 养血清脑颗粒; GC; GC-MS; 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(2011)07-1321-05

GC fingerprint of volatile components in Yangxue Qingnao Granula

LI Wen-bo^{1,2}, HAN Jian-ping², NI Qian^{1,3}, GAO Jun²

1. Department of Pharmaceutical Analysis, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

2. Tianjin Tasly Group Co., Ltd., Tianjin 300402, China

3. Department of Chinese Material Medical Analysis, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

Abstract: Objective To establish GC fingerprint of Yangxue Qingnao Granula and identify the chemical components by GC-MS method. **Methods** The analysis was performed on a DB-5MS (30 m × 0.25 mm, 1 μm) capillary gas chromatography column and the split ratio was 50:1, while the temperatures of FID and inlet were set at 250 ℃; The programmed column temperature was set during the separation: 150 ℃ to 210 ℃ (10 ℃/min, 5 min) then 240 ℃ (3 ℃/min, 10 min); The high pure nitrogen was used as the carrier gas and the flow rate was set at 1 mL/min, and the injection volume was 1 μL. **Results** Ten common peaks were contained according to the common fingerprint of 10 batches of Yangxue Qingnao Granula and the 10 chemical components were identified by a GC-MS method. The comparison of the chromatograms showed good relativity among the medicinal material, intermediate, and preparation. **Conclusion** The analysis method is so precise and repeatable that the chromatogram could be used as characteristic fingerprint for the quality evaluation and control of Yangxue Qingnao Granula.

Key words: Yangxue Qingnao Granula; GC; GC-MS; fingerprint; quality control

养血清脑颗粒是由当归、川芎、白芍、钩藤、鸡血藤、熟地黄、决明子、夏枯草、细辛、延胡索和珍珠母 11 味中药采用现代化制剂工艺技术精制而成,具有养血平肝、活血通络的作用,用于血虚肝亢所致的头痛、眩晕眼花、心烦易怒、失眠多梦等症^[1-2],是国家保护的中药品种,并已进入国外医药市场^[3]。作为多维组分复杂样品的整体性评价

中药质量的有效控制手段,中药指纹图谱是目前能够被国内外广泛接受的全面评价中药质量模式的一种方法^[4-7]。美国 FDA 在植物药制品指导原则中允许申报者提供产品的色谱指纹图谱资料,德国药用植物学会、英国草药典、印度草药典以及加拿大药用及芳香植物学会也都把指纹图谱作为质量控制标准的内容之一^[8]。国内学者也认为,中药质量需综

收稿日期: 2010-10-26

作者简介: 李文博(1986—),黑龙江省佳木斯市人,硕士研究生,研究方向为药物质量控制和现代仪器分析。

Tel: 13602048929 E-mail: liwenbo.allen@163.com

*通讯作者 高钧 Tel: (022)26736533 E-mail: gaojun1@tasly.com

合评价, 指纹图谱分析是对中药及制剂进行综合宏观分析的可行手段之一^[9]。但有关养血清脑颗粒 GC 指纹图谱方面的研究在国内外尚未见报道, 为了更好地控制其质量, 保证临床用药的安全性和有效性, 本实验对其挥发性成分进行 GC 分析, 在方法学考察的基础上建立了养血清脑颗粒挥发性成分的气相指纹图谱, 质谱分析鉴定出共有峰的化学成分并考察了制剂与中间体浸膏和药材的相关性, 为其质量控制提供了更全面的信息。

1 仪器与材料

Aglient 6890 气相色谱仪 (配 FID 检测器, 美国 Agilent 公司); Aglient 6890-5973 GC-MS 联用仪 (美国 Agilent 公司); DB-5MS 石英毛细管色谱柱 (30 m×0.25 mm, 1 μm; 美国 Agilent 公司); Milli-Q 超纯水系统 (法国 Millipore 公司)。

10 批养血清脑颗粒成品 (批号分别为 080502、080604、080609、080613、080620、080621、080622、080626、080629、080702, 依次标记为 S1~S10) 由天津天士力集团制药股份有限公司提供; 当归和川芎药材均由天津天士力集团有限公司分别购于其产地甘肃岷县和四川彭州, 经天津天士力集团研究院高钧博士鉴定均为正品; 所用试剂皆为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 DB-5MS 弹性石英毛细管柱 (30 m×0.25 mm, 1 μm); 柱温: 初始温度 150 °C, 以 10 °C/min 升至 210 °C, 保持 5 min, 3 °C/min 升至 240 °C, 保持 10 min; 载气为高纯氮气, 体积流量 1 mL/min; 燃烧气为高纯氢气, 体积流量 35 mL/min; 助燃气为空气, 体积流量 350 mL/min; 氢火焰离子化检测器温度 250 °C, 进样口温度 250 °C, 分流比 50:1, 进样量 1 μL。

2.2 供试品溶液的制备

2.2.1 养血清脑颗粒供试品溶液的制备 取养血清脑颗粒 12 g 置 250 mL 圆底烧瓶中, 加超纯水 100 mL。参照《中国药典》2010 年版挥发油测定法, 自挥发油测定器上端加醋酸乙酯 2 mL, 保持微沸 7 h, 取醋酸乙酯层置 5 mL 量瓶中, 密封放至室温, 并用醋酸乙酯定容至刻度, 即得供试品溶液。

2.2.2 提取物供试溶液的制备 养血清脑颗粒是先由 11 味药材按照不同的工艺与配比制成 3 种提取物混合浸膏, 再由 3 种浸膏按照比例配制而成。本实验取按养血清脑颗粒工艺流程制备得到的每味药材

提取物及 3 种浸膏适量, 按照“2.2.1”项下方法分别制得药材提取物供试品溶液和浸膏供试品溶液。

2.3 分析时间的确定

取养血清脑颗粒供试品溶液进行分析, 设定分析时间为 60 min。结果表明, 31~60 min 没有色谱峰出现, 31 min 内所有成分出峰完全。

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度试验 取同一供试品溶液 (080502), 连续进样 5 次, 以 8 号色谱峰为参照峰, 测定主要共有峰的相对保留时间和相对峰面积, 结果相对保留时间 RSD 值均小于 0.3%, 相对峰面积 RSD 值均小于 2.4%。

2.4.2 稳定性试验 取同一供试品溶液 (080502), 分别于 0、2、4、8、12、24 h 进样分析 (4 °C 密封保存), 以 8 号色谱峰为参照峰, 其共有峰的相对保留时间 RSD 值均小于 0.5%, 相对峰面积 RSD 值均小于 2.9%, 表明养血清脑颗粒供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.4.3 重现性试验 取同一批样品 (080502) 5 份, 分别制备供试品溶液, 进样检测, 以 8 号色谱峰为参照峰, 其共有峰的相对保留时间 RSD 值均小于 0.9%, 相对峰面积 RSD 值均小于 4.8%。

2.5 指纹图谱相似度分析

2.5.1 指纹图谱的获得 按上述色谱条件测定, 记录色谱图。将 10 个不同批号养血清脑颗粒 (S1~S10) 的测定结果导入国家药典委员会公布的《中药色谱指纹图谱相似度评价系统 A 版》进行处理, 结果见图 1。

2.5.2 特征指纹峰相对保留时间及相对峰面积考察 比较 10 批供试品溶液色谱图给出的相关参数, 发现有 10 个峰是各批样品所共有的, 按出峰时间依次标

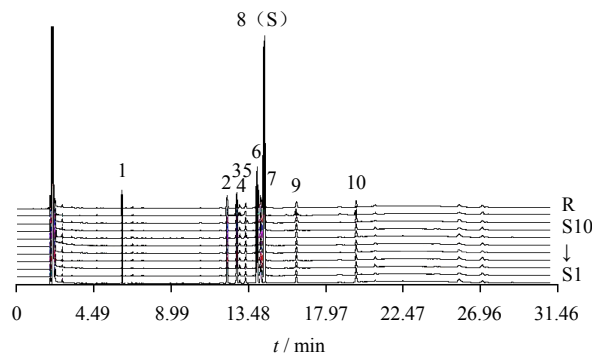


图 1 10 批养血清脑颗粒样品及对照指纹图谱
Fig. 1 GC chromatograms for 10 batches of Yangxue Qingnao Granula and reference fingerprint

定为 1~10 号峰, 且每批非共有峰面积都小于总峰面积的 6%。其中与总峰面积的比值大于 20% 的共有峰为 8 号峰; 大于或等于 10% 的共有峰为 6 号峰; 大于或等于 5% 的共有峰为 3 号峰; 其他 7 个峰峰面积均小于 5%。在所有共有峰中以 8 号的色谱峰积分百分比最大且最稳定, 因此以 8 号峰为参照峰并标号为 S, 计算其余各共有峰相对保留时间及相对峰面积值。10 批供试溶液检测结果见表 1、2。

依据《中药注射剂指纹图谱研究的技术要求》, 供试品图谱中各共有峰面积的比值与指纹图谱中各共有峰峰面积的比值比较, 保留时间小于或等于 30 min 的共有峰: 单峰面积占总峰面积大于或等于

20% 的共有峰, 其差值不得大于 $\pm 20\%$; 单峰面积占总峰面积大于或等于 10%, 而小于 20% 的共有峰, 其差值不得大于 $\pm 25\%$; 单峰面积占总峰面积大于或等于 5%, 而小于 10% 的共有峰, 其差值不得大于 $\pm 30\%$; 单峰面积占总峰面积小于 5% 的共有峰, 峰面积比值不作要求^[10]。由表 1、2 可以看出, 所得结果均满足其要求。

2.5.3 指纹图谱的相似度计算 按照国家药典委员会公布的中药指纹图谱评价软件计算方法, 得到各批次养血清脑颗粒气相指纹图谱相似度计算均在 0.91 以上 (表 3)。

2.6 共有峰的 GC-MS 解析

表 1 10 批养血清脑颗粒特征指纹峰相对保留时间

Table 1 Relative retention time for common peaks of 10 batches of Yangxue Qingnao Granula

色谱峰	10 批养血清脑颗粒相对保留时间									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
S1	0.425 3	0.848 7	0.887 7	0.899 6	0.923 3	0.969 9	0.984 9	1.000 0	1.128 1	1.366 8
S2	0.425 6	0.849 0	0.888 1	0.900 1	0.923 8	0.970 1	0.985 1	1.000 0	1.128 4	1.369 5
S3	0.425 7	0.849 1	0.888 3	0.900 3	0.923 8	0.970 2	0.985 3	1.000 0	1.128 7	1.369 8
S4	0.425 8	0.849 5	0.888 3	0.900 3	0.924 0	0.970 3	0.985 3	1.000 0	1.128 9	1.371 1
S5	0.425 7	0.849 0	0.888 1	0.900 1	0.923 7	0.970 1	0.985 4	1.000 0	1.128 5	1.369 5
S6	0.425 6	0.848 9	0.888 0	0.900 0	0.923 7	0.969 9	0.985 0	1.000 0	1.128 4	1.369 3
S7	0.425 4	0.848 8	0.887 8	0.899 8	0.923 3	0.969 7	0.984 9	1.000 0	1.128 0	1.368 6
S8	0.425 8	0.849 4	0.888 3	0.900 4	0.924 0	0.970 2	0.985 4	1.000 0	1.128 9	1.370 6
S9	0.425 6	0.849 0	0.888 2	0.900 0	0.923 7	0.970 1	0.985 3	1.000 0	1.128 5	1.369 5
S10	0.425 7	0.849 2	0.888 3	0.900 3	0.923 7	0.970 1	0.985 3	1.000 0	1.128 7	1.369 8
RSD/%	0.04	0.03	0.03	0.03	0.03	0.02	0.02	0.00	0.03	0.08

表 2 10 批养血清脑颗粒特征指纹峰相对峰面积

Table 2 Relative peak areas for common peaks of 10 batches of Yangxue Qingnao Granula

色谱峰	10 批养血清脑颗粒相对峰面积									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
S1	0.052 1	0.073 6	0.089 5	0.015 9	0.028 1	0.266 4	0.071 0	1.000 0	0.039 3	0.057 9
S2	0.041 5	0.069 3	0.088 6	0.016 1	0.026 7	0.231 0	0.071 0	1.000 0	0.037 9	0.045 1
S3	0.038 1	0.056 5	0.074 0	0.015 1	0.023 4	0.223 6	0.062 2	1.000 0	0.040 5	0.034 0
S4	0.029 6	0.052 5	0.079 7	0.016 4	0.021 5	0.177 0	0.061 1	1.000 0	0.038 4	0.033 4
S5	0.051 3	0.074 3	0.090 2	0.015 7	0.028 2	0.267 7	0.071 8	1.000 0	0.038 9	0.045 0
S6	0.040 0	0.069 9	0.090 0	0.018 0	0.026 9	0.232 1	0.072 1	1.000 0	0.037 6	0.032 9
S7	0.052 1	0.073 6	0.089 5	0.015 9	0.028 1	0.266 4	0.071 0	1.000 0	0.039 3	0.057 9
S8	0.038 1	0.056 5	0.074 0	0.015 1	0.023 4	0.223 6	0.062 2	1.000 0	0.040 5	0.034 0
S9	0.041 5	0.069 3	0.088 6	0.016 1	0.026 7	0.231 0	0.071 0	1.000 0	0.037 9	0.045 1
S10	0.029 6	0.052 5	0.079 7	0.016 4	0.021 5	0.177 0	0.061 1	1.000 0	0.038 4	0.033 4
RSD/%	22.21	13.80	7.34	5.25	11.01	16.3	6.97	6.62	8.91	25.46

养血清脑颗粒气相成分经 GC-MS 分析并通过 NIST02 质谱库检索, 对选定的 10 个共有峰化学成分进行了鉴定, 结果见表 4。

表 3 10 批养血清脑颗粒指纹图谱的相似度

Table 3 Similarities of 10 batches of Yangxue Qingnao granula

批号	相似度	批号	相似度
080502	0.927	080621	0.915
080604	0.913	080622	0.939
080609	0.963	080626	0.921
080613	0.944	080629	0.953
080620	0.942	080702	0.918

表 4 10 个共有峰化学成分的 GC-MS 鉴定

Table 4 Identification of components in 10 common peaks by GC-MS

峰号	化合物	相对分子质量	分子式
1	2-甲氧基-4-乙烯苯酚	150	C ₉ H ₁₀ O ₂
2	1H-苯并咪唑-2-胺	133	C ₇ H ₇ N ₃
3	3-丁烯苯酐	188	C ₂ H ₁₂ O ₂
4	二十碳烷	282	C ₂₀ H ₄₂
5	甲氧基乙酸	300	C ₁₈ H ₃₆ O ₂
6	2-(1-甲基乙氧基)-1, 2-二苯	254	C ₁₇ H ₁₈ O ₂
7	2-氨基吡啶	108	C ₆ H ₈ N ₂
8	Z-藁本内酯	190	C ₁₂ H ₁₄ O ₂
9	2-烯丙基-4-甲基苯酚	148	C ₁₀ H ₁₂ O
10	十六酸	284	C ₁₈ H ₃₆ O ₂

2.7 制剂-中间体浸膏-君药药材的相关性分析

对养血清脑颗粒和君药当归、川芎以及 3 种中间体浸膏供试溶液的 GC 图谱进行比较分析, 结果见图 2、3。通过图 2 的比较分析可以说明在制剂指纹图谱的 10 个共有峰中, 第 4、5 号峰为川芎独有, 第 1、2、3、6、7、8、9 号峰为川芎和当归所共有; 图 3 表明, 第 1~9 号峰均只来自一种中间体浸膏, 而第 10 号峰则未在任何药材和中间体浸膏的色谱图中出现。

3 讨论

3.1 提取条件的选择

比较了超声提取法、水蒸气蒸馏法两种提取方法和乙醚、醋酸乙酯两种提取溶剂及提取时间对养血清脑颗粒挥发性成分提取的影响。超声提取法获得的色谱峰面积小、个数少, 溶剂消耗量大, 环境污染严重。水蒸气蒸馏法获得的供试溶液为淡黄色澄明液体, 提取的成分较多, 且提取出的组分不污

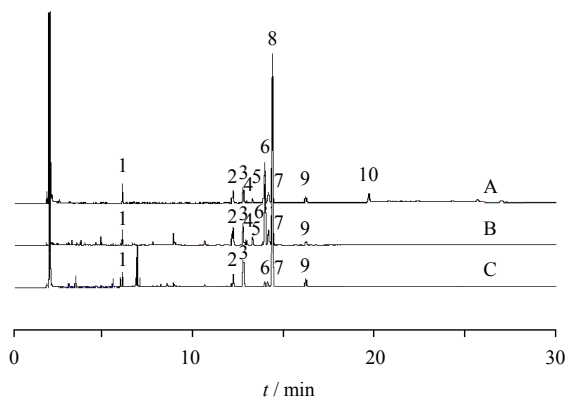


图 2 养血清脑颗粒 (A)、川芎药材 (B)、当归药材 (C) 的 GC 图谱比较

Fig. 2 Comparison on fingerprints of Yangxue Qingnao Granula (A), Chuanxiong Rhizoma (B), and Angelicae Sinensis Radix (C)

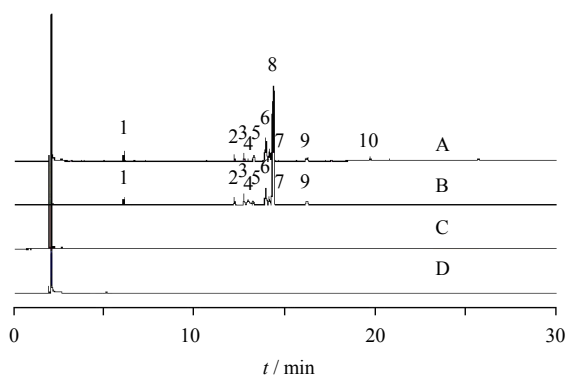


图 3 养血清脑颗粒 (A) 与 3 个浸膏 (B、C、D) 的 GC 图谱比较

Fig. 3 Comparison on fingerprints of Yangxue Qingnao Granula (A) and three extractum (B, C, and D)

染色谱柱。两种提取溶剂提取出的组分基本无差别, 考虑到乙醚的挥发性较醋酸乙酯强, 在提取以及提取物的保存过程中不如醋酸乙酯稳定, 所以本实验采用醋酸乙酯作为提取溶剂; 养血清脑颗粒水蒸气蒸馏提取 4、7、10、13 h 的结果表明, 7 h 即能提取完全。

3.2 色谱条件的选择

分别选用了 5 种不同的弹性石英毛细管柱对养血清脑颗粒的挥发性成分进行了分析和对比: (1) DB-1 (30 m×0.25 mm, 0.25 μm); (2) DB-5MS (30 m×0.25 mm, 0.25 μm); (3) DB-5MS (30 m×0.25 mm, 1 μm); (4) DB-1701 (30 m×0.25 mm, 0.25 μm); (5) DB-INNOWAX (30 m×0.25 mm, 0.25 μm)。结果表明, (2) 和 (3) 获得的色谱峰数目最多, 分离度最好, 分析时间适中, 但二者比较后发

现(2)得到的色谱峰存在严重的前延问题,在调节了进样量、分流比和程序升温等因素后仍不能解决,而(3)得到的色谱图则不存在该问题,因此推断此条件下前延峰是由色谱柱液膜厚度偏薄造成。

实验中对11味药材均进行了指纹图谱研究,由于除了君药川芎和当归之外,其他药材在“2.1”项色谱条件下出峰很少且无与养血清脑颗粒指纹图谱相关的色谱峰,说明其他药材对于养血清脑颗粒气相指纹图谱的贡献很少,加之篇幅限制没有全部列举。由养血清脑颗粒、药材和中间体浸膏的指纹图谱比较分析可知,第10号色谱峰未在任何药材与中间体的图谱中出现,推测可能是由中间体浸膏转化为制剂过程中加入的辅料所致,具体分析结果需进行更为深入的研究。

参考文献

- [1] 高 钧, 孙玉侠, 李 伟, 等. HPLC 法测定养血清脑颗粒中马兜铃酸 A [J]. 中草药, 2005, 36(6): 851-852.
- [2] 张艳军, 高秀梅, 康立源, 等. 养血清脑颗粒对原发性高血压大鼠血压及脑基因表达谱的影响 [J]. 中草药, 2005, 36(9): 1375-1377.
- [3] 朱永宏, 张万良, 赵利斌, 等. 养血清脑颗粒申报进入越南医药市场的体会 [J]. 现代药物与临床, 2010, 25(3): 229-231.
- [4] 葛万霞, 张艳秋, 董根玲. 中药指纹图谱的研究与应用 [J]. 中草药, 2007, 38(10): 附 3-附 4.
- [5] 赵渤年, 于宗渊, 丁晓彦, 等. 黄芩质量评价谱-效相关模式的研究 [J]. 中草药, 2011, 42(2): 380-383.
- [6] 黎 阳, 刘素香, 张铁军, 等. 麻仁软胶囊的指纹图谱研究 [J]. 中草药, 2011, 42(6): 1097-1100.
- [7] 林武霖, 王如伟, 孙柳燕. 延胡索质量控制的研究进展 [J]. 中草药, 2011, 42(2): 409-412.
- [8] 许怀勇. 中药指纹图谱在药品质量控制中的应用 [J]. 医药导报, 2009, 28(2): 218-220.
- [9] 谢培山. 中药色谱指纹图谱鉴别的概念、属性、技术与应用 [J]. 中国中药杂志, 2001, 26(10): 653-655.
- [10] 中药注射剂指纹图谱的技术要求(试行) [S]. 2000.

第十届全国药用植物及植物药学术研讨会

第十届全国药用植物及植物药学术研讨会定于2011年8月10日至12日在素有“春城”美誉的云南省昆明市举行。本次会议由中国植物学会药用植物及植物药专业委员会、中国科学院昆明植物研究所联合主办,由中国科学院昆明植物研究所植物化学与西部植物资源持续利用国家重点实验室承办。会议主题是“多学科交叉,产学研联合,实现西部药用植物资源的可持续利用”,涉及药用植物资源现状与展望、药用植物与植物药资源调查及品质鉴定、药用植物与植物药生物活性物质及其作用机制、药用植物资源保护与可持续利用、药用植物资源与新药研发、中药材 GAP 种植问题与对策、民族民间药研发及产业化、西部药用植物资源实地考察等方面内容。

会议将邀请国内外相关领域院士和知名专家学者就国内外药用植物、植物药、中药、民族药和民间药等方面研究的最新进展、发展趋势及热点等作大会报告,并设分组报告,出版论文摘要集,遴选优秀论文在《植物分类与资源学报》(原《云南植物研究》)发表,提供墙报展览、专家名录等交流平台,是药用植物及植物药学界同仁相聚一堂、共筑未来的盛会。热诚欢迎大家踊跃参加本次学术盛会。

会议组织委员会主席: 谭宁华, 刘吉开, 李德铎

联系人: 李丽玲 单 位: 中国科学院昆明植物研究所 地 址: 云南省昆明市蓝黑路 132 号 (650204)

电子邮件: nhtan2011@mail.kib.ac.cn 办公电话(兼传真): 0871-5223262 会议网址: <http://medplant2011.kib.ac.cn>