

过敏性鼻炎颗粒毛细管气相指纹图谱研究

胡军华^{1,2}, 任继华³, 王 雪^{1,2}, 李家春^{1,2}, 黄文哲^{1,2}, 王振中^{1,2}, 萧 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

3. 中国药科大学, 江苏 南京 210009

摘 要: **目的** 建立过敏性鼻炎颗粒中挥发油的毛细管气相色谱指纹图谱, 为过敏性鼻炎颗粒的质量控制提供新方法。方法 建立毛细管气相色谱法, 采用氢火焰检测器及质谱进行检测分析。HP-5 Phenyl Methyl Siloxane 毛细管色谱柱 (30 m×0.32 mm, 0.25 μm); 检测器温度 250 °C; 进样口温度 200 °C; 柱温采取程序升温, 初始温度 50 °C, 以 3 °C/min 升温至 140 °C, 保持 2 min, 再以 10 °C/min 升温至 200 °C, 保持 2 min。**结果** 建立了过敏性鼻炎颗粒中挥发油的毛细管气相指纹图谱方法, 确定了过敏性鼻炎颗粒中 12 个特征峰, 并采用 GC-MS 对主要色谱峰进行了初步定性。10 批成品指纹图谱相似度在 0.90 以上。**结论** 建立的毛细管气相色谱指纹图谱有较好的精密度、重复性和稳定性, 适用于过敏性鼻炎颗粒的质量控制。

关键词: 过敏性鼻炎颗粒; 毛细管气相色谱; 指纹图谱; 相似度; GC-MS

中图分类号: R286.02 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2016)06-0923-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.06.011

Study on capillary GC fingerprint of Guominxing Biyan Granules

HU Jun-hua^{1,2}, REN Ji-hua³, WANG Xue^{1,2}, LI Jia-chun^{1,2}, HUANG Wen-zhe^{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

3. China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

Abstract: Objective To establish the capillary GC fingerprint of Guominxing Biyan Granules and give a new method for quality control. **Methods** The capillary GC was used. The ingredients of common peaks were analyzed by FID and MS. The HP-5 Phenyl Methyl Siloxane (30 m × 0.32 mm, 0.25 μm) was used for capillary column. The chromatography conditions were as follows: the temperature of inlet was 200 °C in splitless sampling, the detector temperature was 250 °C, the column initial temperature was 50 °C, 3 °C/min rose to 140 °C, keeping 2 min and 10 °C/min rose to 200 °C, keeping 2 min. **Results** Capillary GC fingerprint of volatile oil in Allergic Rhinitis Particles was established. Twelve peaks were selected as the fingerprint peaks of Allergic Rhinitis Particles. The ingredients of common peaks were designated by GC-MS. The similarity between the fingerprint of 10 batches of Allergic Rhinitis Particles Samples were 0.90. **Conclusion** The established capillary GC fingerprint has desirable precision, reproducibility, and stability, and can be applied to the quality control of Guominxing Biyan Granules.

Key words: Guominxing Biyan Granules; capillary GC; fingerprint; similarity; GC-MS

过敏性鼻炎颗粒主治证属风邪犯肺、鼻窍失畅, 或因某些致敏因素导致过敏而见鼻塞、鼻痒、喷嚏、流清涕, 或因过敏性鼻炎发作, 用于鼻敷, 即春季、秋冬季节性过敏性鼻炎, 其功效为疏风宣肺、通利鼻窍。

过敏性鼻炎颗粒处方由辛夷、紫苏叶、荆芥、苍耳子、白芷等 9 味药材组成。其中辛夷、紫苏叶、荆芥、苍耳子、白芷 5 味药材混合提取的挥发油后包合入药。辛夷挥发油具有明显抑制实验性哮喘豚鼠气道浸润 Eos 细胞数, 减轻哮喘气道的炎症反应

收稿日期: 2015-07-13

基金项目: 国家科技部重大新药创制: 现代中药创新集群与数字制药技术平台 (2013ZX09402203)

作者简介: 胡军华, 女, 工程师, 从事新药质量标准研究。Tel: 13655139779 E-mail: hujunhua2001@163.com

*通信作者 萧 伟, 男, 研究员级高级工程师, 博士, 研究方向为中药新药的研究与开发。

Tel/Fax: (0518)81152337 E-mail: kanionlunwen@163.com

的作用,表现出对气道炎症的抑制与改善^[2-3];紫苏叶的挥发油是其重要的药理活性成分;荆芥挥发油具有镇痛、抗炎、扩张支气管和抗过敏等功效。本研究参照有关文献报道^[3-16]采用毛细管气相色谱法建立了过敏性鼻炎颗粒挥发油的指纹图谱,为有效地控制其内在质量提供参考。

1 仪器与材料

Agilent 7890A 型气相色谱仪, FID 检测器。

胡薄荷酮对照品(批号 111706-201205, 质量分数 99.8%), 购自中国食品药品检定研究院, 定量测定用; 水为超纯水; 其余试剂均为分析纯。

紫苏 *Perilla frutescens* (L.) Britt. 的干燥叶(批号 Y140501), 荆芥 *Schizonepeta tenuifolia* Briq. 的干燥地上部分(批号 Y140501), 望春花 *Magnolia biondii* Pamp 的干燥花蕾(批号 Y140501), 白芷 *Angelica dahurica* (Fisch. ex Hoffm.) Benth. et Hook. f. 的干燥根(批号 Y140501), 苍耳 *Xanthium sibiricum* Patr. 的干燥成熟带总苞的果实(批号 Y140501), 由江苏康缘药业股份有限公司质量部吴州研究员提供并鉴定; 过敏性鼻炎颗粒由江苏康缘药业股份有限公司提供, 批号分别为 150101、150102、150103、150201、150202、150203、150204、150401、150402、150403。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 HP-5 Phenyl Methyl Siloxane(固定液为 5%甲基苯基硅氧烷)毛细管柱(30 m×0.32 mm, 0.25 μm)。载气为氮气; 进样口温度 200 °C; 压力 10.631 psi (73.30 kPa); 自动进样, 进样量 1 μL, 分流进样, 分流比 5:1; 柱流量 2.5 mL/min; 压力 10.631 psi (73.30 kPa); FID 检测器, 检测器温度 250 °C; 氢气体积流量 30 mL/min; 空气体积流量 300 mL/min; 氮气流量 27.5 mL/min; 总流量 18 mL/min。柱温采取程序升温方式, 升温程序: 初温 50 °C, 以 3 °C/min 升温至 140 °C, 保持 2 min, 再以 10 °C/min 升温至 200 °C, 保持 2 min。

2.2 参照物溶液的制备

取胡薄荷酮对照品适量, 加醋酸乙酯配成含胡薄荷酮 50 μg/mL 的溶液, 作为对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备

取本品(批号 150201) 10 g, 加热水(温度>90 °C) 50 mL 搅拌使溶解, 放冷离心, 加醋酸乙酯 10 mL 萃取, 取醋酸乙酯层离心, 作为供试品溶液。

2.4 指纹图谱研究

2.4.1 精密度试验 取批号为 150201 的过敏性鼻炎颗粒, 按“2.3”项方法制备供试品溶液, 照“2.1”项方法连续进样 6 次进行测定。考察峰面积大于总峰面积 3%的色谱峰的相对保留时间和相对峰面积, 结果各色谱峰相对保留时间 RSD 均≤0.56%, 相对峰面积值 RSD 均≤2.31%, 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, 结果相似度结果均不小于 0.99, 符合指纹图谱的技术要求。表明该方法精密度良好。

2.4.2 稳定性试验 取批号为 150201 的过敏性鼻炎颗粒, 按“2.3”项方法制备供试品溶液, 照“2.1”项方法于 0、1、2、3、6、9 h 分别测定 1 次指纹图谱, 共测 6 次, 考察峰面积大于总峰面积 3%的色谱峰的相对保留时间和相对峰面积。结果各色谱峰相对保留时间 RSD 均≤0.07%, 相对峰面积值 RSD 均≤1.37%, 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, 结果相似度结果均不小于 0.99, 表明供试品溶液在 9 h 内稳定。

2.4.3 重复性试验 取批号为 150201 的过敏性鼻炎颗粒, 按“2.3”项方法制备供试品溶液, 平行制备 6 份, 照“2.1”项方法测定指纹图谱, 考察峰面积大于总峰面积 3%的各色谱峰的相对保留时间和相对峰面积值, 结果各色谱峰相对保留时间 RSD 均≤0.05%, 相对峰面积值 RSD 均≤3.71%, 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, 结果相似度结果均不小于 0.99, 表明该方法可较好重复。

根据以上方法学考察结果, 表明该方法测定过敏性鼻炎颗粒指纹图谱, 精密度、重复性、稳定性均较好, 能够准确测定该制剂的指纹图谱。

2.4.4 指纹图谱的建立 分别取 10 批不同批号的过敏性鼻炎颗粒, 按“2.3”项方法制备供试品溶液, 分别测定。将 10 批过敏性鼻炎颗粒指纹图谱导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统的操作规范软件(版本 2004A)”, 对色谱峰进行多点校正后, 自动匹配, 生成对照指纹图谱(R, 图 1), 共标定 12 个共有峰, 其中胡薄荷酮为参照峰(S), 批号为 150101、150102、150103、150201、150202、150203、150204、150401、150402、150403 的过敏性鼻炎颗粒样品与对照指纹图谱比较相似度分别为 0.984、0.979、0.993、0.979、0.991、0.991、0.993、0.980、

0.978、0.993，均在 0.979~0.993。

2.5 药材与成品相关性研究

分别取过敏性鼻炎颗粒处方中紫苏叶、荆芥、苍耳子、白芷、辛夷 5 味药材适量至 1 L 圆底烧瓶中，加水至容器体积 1/3，连接挥发油提取器和球形冷凝管，用电热套加热，回流提取 6 h，用醋酸乙酯溶解并分取挥发油至 10 mL 量瓶中，用醋酸乙酯定容至刻度，作为供试品溶液；按照成品指纹图谱方法测定。5 味药材与成品相关性见图 2。

由相关性图谱可知，过敏性鼻炎颗粒指纹图谱

中 1、2、4、6、7 号峰主要来源于辛夷；3 号峰主要来源于紫苏叶、辛夷；8 (S) 号峰主要来源于荆芥；9 号峰主要来源于紫苏叶、苍耳子；10 号峰主要来源于苍耳子、紫苏叶，11 号峰主要来源于白芷。

2.6 GC-MS 对指纹图谱峰定性研究

应用 GC-MS 联用技术，对过敏性鼻炎颗粒指纹图谱中的峰进行了初步定性。气相色谱条件同“2.1”项下色谱条件；质谱条件：EI 离子源（-70 eV），离子源温度 230 ℃，气相色谱仪与质谱仪连接器接口温度 250 ℃，载气为氦气；总离子流图（TIC）

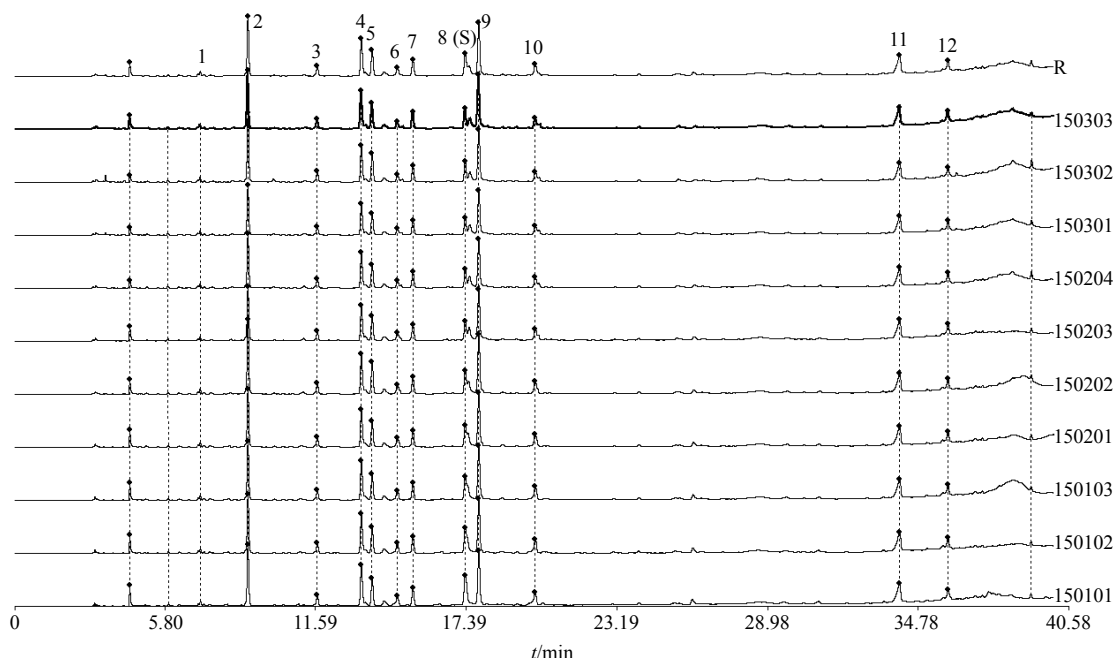


图 1 10 批过敏性鼻炎颗粒指纹图谱

Fig. 1 Fingerprint of 10 batches of Guominxing Biyan Granules

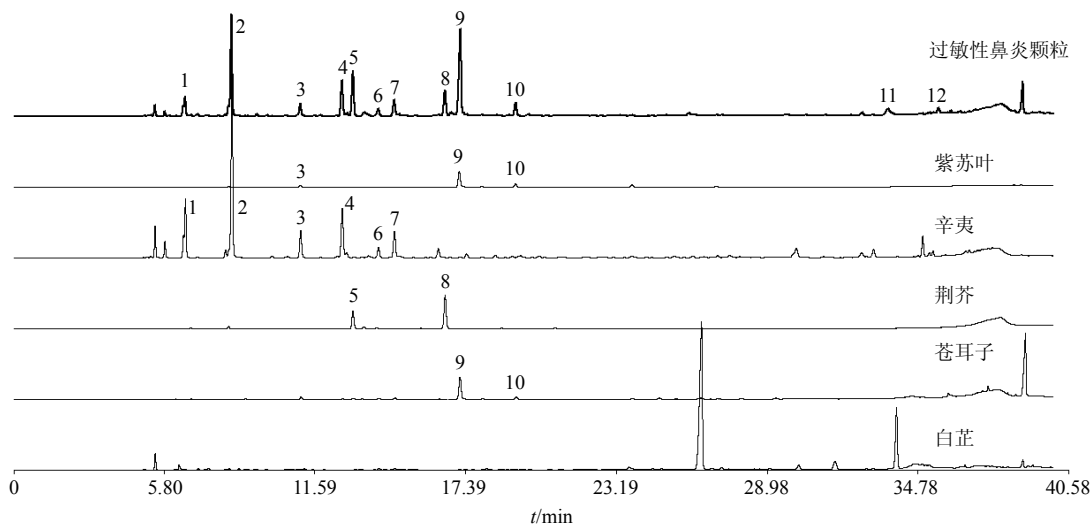


图 2 成品与药材相关性指纹图谱

Fig. 2 Correlation fingerprint between Guominxing Biyan Granules and medicinal materials

见图 3。通过计算机内系统解卷积检索出图谱中可能存在的化合物^[17-31], 并根据 NIST 系统质谱图库检索匹配, 确认结构。参考标准质谱图集及有关文献, 初步确定该挥发油中 12 个特征峰化学成分及结构, 见表 1。其中, 2、4、6、7 号峰与辛夷单味药

相关, 与文献报道一致^[18-19], 5、8 号峰与荆芥单味药相关, 与文献报道一致^[20], 9 号峰与紫苏叶相关, 与文献报道一致^[21-23], 1、3、10、11、12 号峰目前没有检索到与其一致的相关文献, 有待于进一步分析鉴定。

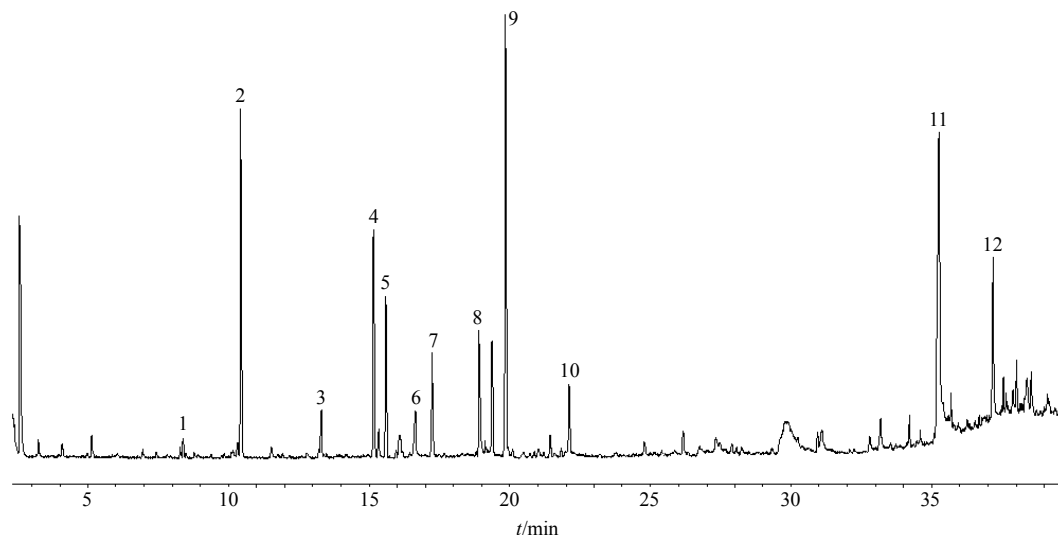


图 3 过敏性鼻炎颗粒 TIC 色谱图

Fig. 3 TIC of Guominxing Biyan Granules

表 1 过敏性鼻炎颗粒 GC 共有峰化学成分归属

Table 1 Attribution of ingredients in GC common peaks of Guominxing Biyan Granules

峰号	化学成分	分子式	相对分子质量	来源
1	β -檀香醇	$C_{15}H_{24}O$	220	辛夷
2	桉叶素	$C_{10}H_{18}O$	154	辛夷
3	3,7-二甲基-1,6-辛二烯-3-醇	$C_{10}H_{18}O$	154	辛夷、紫苏叶
4	樟脑	$C_{10}H_{16}O$	152	辛夷
5	左旋薄荷酮	$C_{10}H_{18}O$	154	荆芥
6	松油烯-4-醇	$C_{10}H_{18}O$	154	辛夷
7	α -松油醇	$C_{10}H_{18}O$	154	辛夷
8	胡薄荷酮	$C_{10}H_{16}O$	152	荆芥
9	2-己酰基呋喃	$C_{10}H_{14}O_2$	166	紫苏叶、苍耳子
10	4-(1,1-二甲基丙基)苯酚	$C_{11}H_{16}O$	164	苍耳子、紫苏叶
11	4-羟基-苯乙酸甲酯	$C_9H_{10}O_3$	166	白芷
12	1-(2,4-二羟基苯基)-2-(4-甲氧基-3-硝基苯基)乙酮	$C_{15}H_{13}NO_6$	303	—

3 讨论

色谱条件确认过程中, 对色谱条件下 4 种升温程序及分流比进行了考察, 以“2.1”项色谱条件分离效果最好, 因此选择用该条件作为过敏性鼻炎颗粒测定色谱条件。

为了更好地建立指纹图谱, 考察了直接提取挥发油、乙醇提取、醋酸乙酯提取、热水溶解醋酸

乙酯萃取 4 种方法下获得的挥发油指纹图谱, 经比较分析, 确定热水溶解醋酸乙酯萃取的提取方式最佳。该提取方式简单, 提取时间短, 获得的挥发油成分丰富, 收率高, 指纹图谱中, 除已知成分胡薄荷酮能够较好的辨别出外, 其他成分指纹峰也能被较好地体现, 且各峰分离度好, 谱图清晰, 所以最终选择这种提取方式。

过敏性鼻炎颗粒挥发油样品对比各药材时, 5味药材中荆芥、紫苏叶、辛夷挥发油的量较高, 体现在气相图谱中有明显对应峰且强度较大。针对过敏性鼻炎颗粒全面质量控制, 还需要进一步研究。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [2] 吴艳丽, 危红华, 张朵朵, 等. 辛夷挥发油鼻腔醇质体喷雾剂的制备及其质量评价 [J]. 中草药, 2014, 45(10): 1393-1397.
- [3] 聂晶, 田颂九, 王国荣. 中药指纹图谱的研究现状 [J]. 中草药, 2000, 31(12): 881-882.
- [4] 郑恒, 魏日胞, 陈香美, 等. 中药质量标准与中药指纹图谱 [J]. 中国医院药学杂志, 2003, 23(2): 112-113.
- [5] 郑琦, 方悦. 气相色谱技术在中药指纹图谱中的应用 [J]. 浙江中西医结合杂志, 2008, 18(11): 713-714.
- [6] 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(1): 122-123.
- [7] 戴静波, 张雅娟, 周俊慧. 荆芥挥发油的气相指纹图谱研究 [J]. 中国药师, 2014, 17(4): 560-562.
- [8] 张赞赞, 李嘉, 姜平川. 荆芥挥发油气相色谱指纹图谱研究 [J]. 中医药导报, 2014, 20(14): 52-53.
- [9] 伍永富, 秦少容, 刘世琪. 紫苏叶油的研究进展 [J]. 时珍国医国药, 2007, 18(8): 2019-2020.
- [10] 刘浏. 紫苏叶的研究进展 [J]. 中国医学创新, 2012, 9(6): 162-163.
- [11] 唐英, 陈欣, 沈平孃. 紫苏叶中挥发油类成分的指纹图谱研究 [J]. 上海中医药杂志, 2013, 47(9): 82-85.
- [12] 于培明, 田智勇, 许启泰, 等. 辛夷研究的新进展 [J]. 时珍国医国药, 2005, 16(7): 652-653.
- [13] 赵欧, 梁逸曾. 辛夷挥发油不同提取方法的研究 [J]. 质谱学报, 2007, 28(2): 110-112.
- [14] 夏黎明, 姚成. 中药白芷的研究现状 [J]. 中医药研究, 2002, 18(5): 56-57.
- [15] 徐植灵, 潘炯光, 赵中振. 辛夷挥发油的研究 [J]. 中国中药杂志, 1989, 14(5): 15-18.
- [16] 盛菲亚, 卢君蓉, 彭伟, 等. 香附炮制前后挥发油的 GC-MS 指纹图谱对比研究 [J]. 中草药, 2013, 44(23): 3321-3327.
- [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] 李晓, 姚光明, 邬亚萍, 等. 辛夷挥发油化学组分的 GC/MS 分析及在卷烟加香中的应用 [J]. 烟草科技, 2002, 177(4): 6-8.
- [19] 何娟, 杨柳, 李艳福, 等. 中药材辛夷挥发油 GC-MS 指纹图谱的建立 [J]. 分析测试学报, 2008, 27(4): 423-425.
- [20] 方明月, 康文艺, 姬志强, 等. 荆芥挥发油化学成分研究 [J]. 时珍国医国药, 2007, 18(7): 1551-1552.
- [21] 林硕, 邵平, 马新, 等. 紫苏挥发油化学成分 GC/MS 分析及抑菌评价 [J]. 核农学报, 2009, 23(3): 477-481.
- [22] 冯吉力, 王薇, 余陈欢. 紫苏叶挥发油化学成分分析及其抗炎机制研究 [J]. 海峡药学, 2011, 23(5): 46-47.
- [23] 王健, 薛山, 赵国华. 紫苏不同部位精油成分及体外抗氧化能力的比较研究 [J]. 食品科学, 2013, 34(7): 86-91.
- [24] 聂红, 沈映君. 白芷挥发性的 GC-MS 分析 [J]. 广州化工, 2002, 24(2): 59-60.
- [25] 朱立俏, 盛华刚. 白芷挥发性成分的 GC-MS 分析 [J]. 广州化工, 2012, 40(23): 103-104.
- [26] 郭耀杰, 吴卫, 李静夜, 等. 川白芷不同品种 (系) 挥发油成分 GC-MS 分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(8): 113-115.
- [27] 胡志妍, 齐天, 杨光, 等. 白芷、川芎药对配伍挥发油成分的 GC-MS 分析 [J]. 第二军医大学学报, 2014, 35(2): 177-184.
- [28] 黄文华, 余竞光, 孙兰, 等. 中药苍耳子的化学成分研究 [J]. 中国中药杂志, 2005, 30(13): 1027-1028.
- [29] 王淑萍, 张桂珍, 高英. 苍耳子挥发油化学成分分析 [J]. 长春工程学院学报, 2007, 8(2): 82-83.
- [30] 阮贵华, 李攻科. 苍耳子的化学成分及其分离分析研究进展 [J]. 中成药, 2008, 30(3): 421-422.
- [31] 胡迪, 王耀登, 吴慧, 等. 苍耳子炒制前后挥发油和脂肪油成分 GC-MS 分析 [J]. 湖北中医药大学学报, 2012, 14(6): 29-31.