

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

廖强^{1,2}, 孙良广^{1*}, 韦日伟¹, 刘珈伶²

1. 梧州市食品药品检验所, 广西 梧州 543002

2. 广西-东盟食品药品安全检验检测中心, 广西 南宁 530000

摘要: 目的 利用气相色谱-串联三重四级杆质谱 (GC-MS/MS) 结合自动解卷积技术对沉香化气片中挥发性成分进行分析筛查并采用多离子反应监测技术 (MRM) 建立沉香化气片中多种成分 (樟脑、乙酸龙脑酯、百秋李醇) 含量测定的方法。方法 采用 HP-5MS 色谱柱 (30 m×0.32 mm, 0.25 μm); 升温程序: 初始温度 100 °C, 以 15 °C/min 升温至 300 °C, 保持 2 min; 进样口温度 280 °C; 电离方式: EI 离子源 (70 eV), 离子源温度 230 °C; 四级杆温度 150 °C; 接口温度 280 °C; 进样量为 1 μL。结果 使用解卷积软件共筛选出 13 个成分, 在设定的 MRM 条件下樟脑、乙酸龙脑酯、百秋李醇质量浓度分别在 4.5~90 μg/mL ($r=0.999\ 8$)、3.3~66 μg/mL ($r=0.999\ 8$)、2.6~51.5 μg/mL ($r=0.999\ 9$) 与其峰面积的比值呈良好的线性关系; 平均回收率 ($n=6$) 分别为 101.15%、102.64%、100.10%; 10 批样品樟脑、乙酸龙脑酯、百秋李醇质量分数分别在 0.278~0.311、0.381~0.438、0.229~0.381 mg/g。结论 该方法准确、简便, 重复性好, 可用于同时测定沉香化气片中樟脑、乙酸龙脑酯、百秋李醇的含量并为该品种质量的提高提供了参考依据。

关键词: GC-MS/MS; 自动解卷积; 沉香化气片; 樟脑; 乙酸龙脑酯; 百秋李醇

中图分类号: R284 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)17-4009-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.17.007

Applications of GC-MS/MS automated mass spectral deconvolution and multi reaction monitor qualitative and quantitative analysis of volatile components of Chenxiang Huaqi Tablets

LIAO Qiang^{1,2}, SUN Liang-guang¹, WEI Ri-wei¹, LIU Jia-ling²

1. Wuzhou Institutes for Food and Drug Control, Wuzhou 543002, China

2. Guangxi-Asean Center for Food and Drug Safety Control, Nanning 530000, China

Abstract: **Objective** To analytically screen the volatile components from Chenxiang Huaqi Tablets (CHT) using gas chromatography-triple quadrupole mass spectrometry (GC-MS/MS) combined with automated mass spectral deconvolution, and establish the methods of multiple components contents (camphor, bornyl acetate, and patchouli alcohol) from CHT using multi reaction monitor (MRM). **Methods** The chromatographic column was HP-5MS (30 m × 0.32 mm × 0.25 μm). Temperature program: the initial temperature was 100 °C, at 15 °C/min up to 300 °C for 2 min. Injection port temperature was 280 °C; Ionization methods: EI ion source with ion source temperature of 230 °C; Quadrupole temperature was 150 °C; Interface temperature was 280 °C; Inject volume was 1 μL. **Results** A total of thirteen components were screened by automated mass spectral deconvolution soft. Under the conditions of MRM collection, camphor, bornyl acetate, and patchouli alcohol were in the range of 4.5—90 mg/mL ($r=0.999\ 8$), 3.3—66 mg/mL ($r=0.999\ 8$), and 2.6—51.5 mg/mL ($r=0.999\ 9$), respectively, the ratio of each component concentration to its peak area was linear, and the average recovery ($n=6$) was 101.15%, 102.64%, and 100.10% respectively; The mass fraction of 10 batches of samples were in the ranges of 0.278—0.311, 0.381—0.438, and 0.229—0.381. **Conclusion** The method is accurate, simple, and good repeatability. It can be used for the simultaneous determination of camphor, bornyl acetate, and patchouli alcohol in CHT, which provides a reference for the improvement of the quality of this variety.

Key words: GC-MS/MS; automated mass spectral deconvolution; Chenxiang Huaqi Tablets; camphor; bornyl acetate; patchouli alcohol

收稿日期: 2017-11-08

作者简介: 廖强 (1985—), 男, 本科, 主管药师, 研究方向为食品、药品质量分析及监管。E-mail: 19972802@qq.com

*通信作者 孙良广 (1985—), 男, 本科, 主管药师, 研究方向为食品、药品质量分析及监管。E-mail: 511294805@qq.com

沉香化气片 (ChenXiang HuaQi Tablets) 是由沉香、木香、广藿香、砂仁、香附 (醋制)、陈皮、莪术 (醋制) 等 10 味中药制备而成的制剂, 具有理气疏肝、消积和胃的功效。处方中砂仁、广藿香、木香为主药, 砂仁具有治疗脾胃气滞的作用, 广藿香具有调节胃肠功能的作用, 其中的挥发性成分对理气疏肝、调中导滞、脘痞不饥有很好的治疗作用^[1-3]。樟脑、乙酸龙脑酯、龙脑等为砂仁挥发油的主要组成成分, 砂仁中除了所熟知的乙酸龙脑酯具有镇痛抗炎的作用外, 樟脑具有镇痛作用^[4], 百秋李醇为广藿香的主要挥发性成分, 一直作为广藿香质量评价的指标成分。目前国内外关于沉香化气片挥发性成分和含量测定方法的研究极少, 仅有气相色谱测定百秋李醇含量的文献报道^[5-7], 其他挥发性成分未有相关研究, 而该品种的质量标准仅有性状、鉴别、检查项, 无法很好体现其质量优劣^[8], 该品种的丸剂剂型研究较多且标准较完善^[9-10], 但 2 个品种制法工艺相差较大, 成分也不尽相同, 鉴于此, 本研究采用了 GC-MS/MS 对沉香化气片挥发性成分进行分析。在非靶标筛查中, 最常使用的质谱扫描方式为全扫描模式 (full scan), 但长期以来全扫描模式因为灵敏度低及基质效应导致待测物谱图匹配度差的问题, 阻碍其推广及应用^[11]。因此获得一个匹配度高的质谱图成为非靶标筛查的关键。解卷积技术 (AMDIS) 能够采集每个离子的质量色谱图, 并将所有保留值和形状相同的质量色谱峰的离子组合成一张质谱图^[12]。运用质谱图及相关色谱信息从而确定该成分是否能被认定为对照数据库中的某一个化合物, AMDIS 在提高全扫描模式的选择性及定性结果的准确性上表现出强大的功能^[13]。本实验采用 GC-MS/MS 检测分析沉香化气片, 并利用 AMDIS 解卷积软件和标准 NIST 谱库对挥发成分进行非靶标筛查, 采用多离子反应监测 (MRM) 模式同时对沉香化气片中樟脑、乙酸龙脑酯、百秋李醇的含量进行测定, 该应用为沉香化气片的有效成分质量研究提供了更为科学的依据。

1 仪器与材料

XA205DU 电子分析天平, 十万分之一, 德国 Sartorius 公司; 7890B-7000C 气相色谱-三重四级杆串联质谱仪, 美国安捷伦公司。

对照品樟脑 (批号 110741-200507, 质量分数 100%)、乙酸龙脑酯 (批号 110759-201105, 质量分数 99.6%)、百秋李醇 (批号 110772-201407, 质量

分数 93.5%) 均购自中国食品药品检定研究院; 沉香化气片 (太极集团重庆桐君阁药厂有限公司生产, 批号 16030021、16090062、16100068、16110058、16110033、16100078、16120021、16120011、16080051、16090052) 均在当地药房购买; 甲醇为色谱纯, 其他试剂为分析纯。

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 对照品储备液 分别精密称取 3 种对照品适量, 加甲醇稀释制成含樟脑 0.450 mg/mL、乙酸龙脑酯 1.316 mg/mL、百秋李醇 0.642 mg/mL 的对照品储备液。

2.1.2 混合对照品溶液 分别吸取“2.1.1”项下储备液樟脑 2 mL、乙酸龙脑酯 0.5 mL、百秋李醇 0.8 mL 置于同一 5 mL 量瓶中, 甲醇稀释, 制成含樟脑 0.180 mg/mL、乙酸龙脑酯 0.132 mg/mL、百秋李醇 0.103 mg/mL 的混合对照品溶液。

2.1.3 供试品溶液 取装沉香化气片样品, 用研钵将样品研细, 精密称取样品粉末 1.0 g, 精密加甲醇 20 mL, 称定质量, 超声 30 min, 用甲醇补足减失的质量, 滤过, 取续滤液经过 0.22 μm 针孔滤膜滤过, 即得。

2.1.4 阴性样品溶液 按照卫生部《部颁标准中药成方制剂》第七册沉香化气片质量标准中的处方工艺, 分别制备不含砂仁、广藿香的样品, 分别按“2.1.3”项下方法制备阴性样品溶液。

2.2 色谱和质谱条件

色谱柱为 HP-5MS (30 m $\times$ 0.32 mm, 0.25 μm), 升温程序: 初始温度 100 $^{\circ}\text{C}$, 以 15 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升至 300 $^{\circ}\text{C}$, 保持 2 min; 进样口温度 280 $^{\circ}\text{C}$; 电离方式: EI 离子源, 能量 70 eV; 采集模式: 分别采用 Full Scan 和 MRM; 离子源温度 230 $^{\circ}\text{C}$; 四级杆温度 150 $^{\circ}\text{C}$; 接口温度 280 $^{\circ}\text{C}$; 电子倍增器电压 1 875 V; 载气为高纯氦气, 采用不分流进样, 进样量为 1 μL 。分别取供试品、混合对照品, 注入 GC-MS/MS 分析, 使用全扫描模式得样品色谱图, 再利用解卷积软件对色谱图进行分析及匹配 NIST14 质谱库, 结果最终确认 13 个成分, 定性分析结果见表 1, 定量各组分 MRM 条件见表 2, 解卷积分析图见图 1, 定量 MRM 图见图 2。

2.3 线性关系考察

分别精密吸取“2.1.2”项下混合对照品溶液 0.125、0.25、0.5、1.25、2.5 mL 至 5 mL 量瓶中,

表 1 解卷积定性化合物结果

Table 1 Qualitative results of deconvolution compounds

峰号	化合物名称	CAS 号	分子式	t_R /min	相对含量/%
1	樟脑	464-49-3	C ₁₀ H ₁₆ O	3.745	12.16
2	乙酸龙脑酯	5655-61-8	C ₁₂ H ₂₀ O ₂	4.985	5.41
3	4,7-methanoazulene	514-51-2	C ₁₅ H ₂₄	5.819	6.04
4	α -愈创木烯	3691-12-1	C ₁₅ H ₂₄	6.285	1.20
5	塞舌尔烯	52617-34-2	C ₁₅ H ₂₄	6.329	4.38
6	甘菊环	3691-11-0	C ₁₅ H ₂₄	6.839	6.34
7	十二碳烷硫醇	112-55-0	C ₁₂ H ₂₆ S	7.070	2.52
8	百秋李醇	5986-55-0	C ₁₅ H ₂₆ O	8.041	21.30
9	十六烷酸	1957-10-3	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	10.209	15.52
10	十八烷酸	1957-11-4	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	11.377	5.04
11	油酸酰胺	301-02-0	C ₁₈ H ₃₅ NO	12.436	8.88
12	2,2'-亚甲基双-(4-甲基-6-叔丁基苯酚)	119-47-1	C ₂₃ H ₃₂ O ₂	12.733	3.05
13	二硫醚	2757-37-1	C ₂₄ H ₅₀ S ₂	15.235	8.17

表 2 定量各组分 MRM 条件

Table 2 Quantitative component MRM conditions

化合物	母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	驻留时间/ms	碰撞能量/ eV
樟脑	152.2	93.1	150	18
		108.2*	150	2
乙酸龙脑酯	136.1	93.1*	150	10
		121.0	150	5
百秋李醇	222.2	123.1	150	20
		151.1*	150	5

*为定量离子

*quantitative ion

用甲醇定容至刻度,依照上述方法测定。以质量浓度对峰面积积分值进行线性回归,求得回归方程,按照“2.2”项下色谱条件测定。结果得樟脑的回归方程为 $Y=2.6 \times 10^3 X-200$ ($r=0.9998$); 乙酸龙脑酯的回归方程为 $Y=1.3 \times 10^3 X-1.1 \times 10^3$ ($r=0.9998$); 百秋李醇的回归方程为 $Y=2.3 \times 10^3 X-740$ ($r=0.9999$), 结果表明樟脑在 4.5~90 $\mu\text{g/mL}$ 、乙酸龙脑酯在 3.3~66 $\mu\text{g/mL}$ 、百秋李醇在 2.6~51.5 $\mu\text{g/mL}$, 各成分质量浓度与峰面积比值呈良好的线性关系。

2.4 重复性试验

取同一批样品(批号 16030021) 1 g, 共 6 份, 按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液, 按“2.2”项下色谱条件平行试验, 结果测得樟脑、乙酸龙脑酯、百秋李醇的平均质量分数分别为 0.292、0.127、0.362 mg/g, RSD 分别为 0.8%、0.7%、0.9%, 表明样品测定重复性良好。

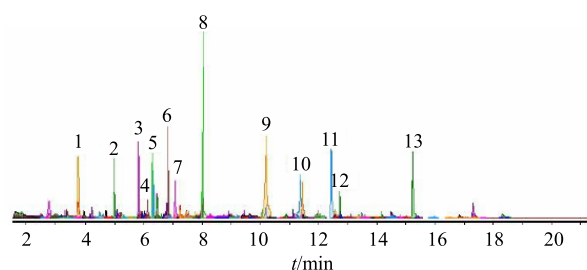


图 1 解卷积 Full-Scan 分析图

Fig. 1 Deconvolution Full-Scan analysis

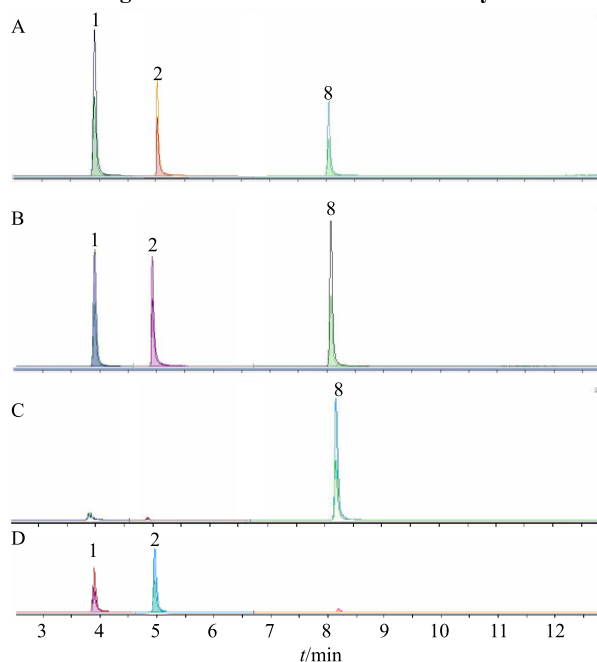


图 2 对照品 MRM (A)、供试品 MRM (B) 及缺砂仁 (C)、缺广藿香 (D) 阴性样品 MRM 的 GC-MS/MS 色谱图

Fig. 1 GC-MS/MS chromatogram reference sample (A), test sample (B), negative sample without *Amomi Fructus* (C) and negative sample without *Pogoste Monis Herba* (D) in mode of MRM

2.5 精密度试验

精密吸取“2.1.2”项下混合对照品溶液，连续进样 6 次，记录峰面积，结果测得樟脑、乙酸龙脑酯、百秋李醇峰面积的 RSD 分别为 1.4%、0.9%、1.0%，表明仪器精密度良好。

2.6 稳定性试验

取同一供试品（批号 16030021）溶液，室温下放置，分别于 0、2、4、8、16 h 依法测定。测得樟脑、乙酸龙脑酯、百秋李醇峰面积的 RSD 分别为 1.0%、1.0%、0.8%，表明供试品溶液在 16 h 内稳定。

2.7 加样回收率试验

取平行 6 份已知指标成分量（含樟脑 0.292 mg/g、乙酸龙脑酯 0.381 mg/g、百秋李醇 0.362 mg/g）的沉香化气片样品（批号 16030021），每份约 0.5 g 精密称定，分别置于锥形瓶中，分别加入“2.1.1”项下对照品溶液适量，按“2.1.3”项下制备方法制备供试品溶液，在拟定色谱条件下进样分析，计算加样回收率，结果樟脑、乙酸龙脑酯、百秋李醇的平均回收率分别为 101.15%、102.64%、100.10%，RSD 分别为 0.8%、1.7%、1.0%。

2.8 样品测定

取 10 批沉香化气片样品，按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液，按“2.2”项色谱条件进行测定，记录峰面积，计算各成分质量分数，结果见表 3。结果表明，本方法通过 MRM 模式进行测定有效的减少了杂质对目标化合物的干扰，提高了样品含量的准确性，具有较普遍的适用性。

表 3 样品定量测定结果

Table 3 Quantitative result of contents in samples

批号	质量分数/(mg·g ⁻¹)		
	樟脑	乙酸龙脑酯	百秋李醇
16030021	0.292	0.381	0.362
16090062	0.291	0.429	0.246
16100068	0.278	0.405	0.235
16110058	0.282	0.438	0.268
16110033	0.291	0.396	0.311
16100078	0.278	0.414	0.325
16120021	0.302	0.423	0.229
16120011	0.298	0.384	0.381
16080051	0.311	0.435	0.281
16090052	0.282	0.405	0.318

3 讨论

3.1 指标性成分的确定

挥发性成分是沉香化气片理气疏肝、消积和胃作用的主要有效成分，其中砂仁、广藿香均有治疗胸脘胀痛、肝胃气滞的功效，故结合本实验中样品使用解卷积筛选的成分结果，选取上述药材中的主要成分樟脑、乙酸龙脑酯、百秋李醇作为评价沉香化气片的质量指标进行检测。

3.2 提取方法的选择

分别采用了超声法、冷浸法和索氏提取法进行提取，选取样品中较有代表性的 10 个峰面积进行参考，结果超声法与索氏提取法均优于冷浸法，超声法与索氏提取法效果基本相当，但耗时较长，主要是由于超声波增加了溶剂的穿透力，促进提取的进行，效果最佳，因此选择超声法进行提取；再对提取时间（15、30 和 45 min）、提取溶剂（醋酸乙酯、正己烷、甲醇）进行考察，结果甲醇提取的样品相比醋酸乙酯、正己烷提取的样品在全扫描模式下峰的数量多、组分提取完全且毒性低；超声 30 min 与超声 45 min 差别不明显。

3.3 质谱 MRM 参数的优化

三重四级杆质谱参数优化的重点是母离子和子离子及其碰撞电压值的优化。因在实验中分 3 段采集，故离子对的驻留时间均设为 150 ms，碰撞电压 0~40 eV，一般情况下根据各物质全扫描谱图选择丰度较高的离子作为母离子，而樟脑和乙酸龙脑酯则选择了丰度较低的离子 m/z 152.2 和 136.1 作为母离子，主要是由于这 2 个物质中丰度比较大的 m/z 80.9、94.9、120.9 离子裂解后的子离子质量数较低，易被其他物质干扰。

本实验通过采用自动解卷积软件结合 GC/MS/MS 对沉香化气片中挥发性成分进行了分析筛查，解决了沉香化气片中基质复杂造成的非靶标筛查难的问题，最终确认了 13 个成分，还建立了使用 MRM 模式同时测定沉香化气片中樟脑、乙酸龙脑酯、百秋李醇含量的方法，该方法操作简便、准确、可靠、重复性好，适用于沉香化气片样品的定性和定量分析。

参考文献

- [1] 张建春, 蔡雅明, 周德斌, 等. 木香的研究进展 [J]. 甘肃科技, 2010, 26(20): 171-173.
- [2] 柯春文, 梁 敏. 气相色谱法测定砂仁中乙酸龙脑酯

- 的含量 [J]. 今日药学, 2010, 20(2): 16-17.
- [3] 张旭, 姜滢津子, 侯影. 木香及其麸煨品挥发油化学成分的气相色谱-质谱联用测定 [J]. 时珍国医国药, 2011, 22(6): 1355-1357.
- [4] 鲁艺, 申丽, 王洋, 等. 砂仁挥发油中7种活性成分的含量测定研究 [J]. 药物分析杂志, 2016, 36(9): 1536-1543.
- [5] 朱月辉, 纪开明. GC法测定沉香化气片中的百秋李醇的含量 [J]. 内蒙古中医药, 2016, 35(11): 139.
- [6] Peng M, Deng N, Liu W, *et al.* Simultaneous determination of muscone, β -asarone, patchoulic alcohol, borneol, menthol in compound Shexiang injection by GC-MS [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2014, 34(4): 855-858.
- [7] Sirén H, Kaijanen L, Kaartinen S, *et al.* Determination of statins by gas chromatography-EI/MS-MS-Tandem mass spectrometry: Fermentation of pine samples with *Pleurotus ostreatus* [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2014, 94(6): 196-202.
- [8] 药品标准中药成方制剂第七册 [S]. 1993.
- [9] 马丽娜, 郭伟英. 毛细管气相色谱法同时测定沉香化气丸中3个成分的含量 [J]. 药物分析杂志, 2012, 32(9): 1559-1563.
- [10] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [11] 曹赵云, 牟仁祥, 吴俐, 等. 程序升温大体积进样和解卷积气相色谱-质谱法测定蔬菜水果中32种农药残留量 [J]. 色谱, 2014, 32(12): 1390-1399.
- [12] Mallard W G. AMDIS in the chemical weapons convention [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2014, 406(21): 5075-5086.
- [13] 王刚, 马慧莲, 王龙星, 等. 气相色谱-质谱-自动质谱解卷积技术在沉积物和污泥中有机污染物非靶标筛查中的应用 [J]. 色谱, 2015, 33(12): 1294-1300.