

一测多评法同时测定大活络丸中 16 种挥发性成分含量

蔺瑞丽^{1,3}, 刘康康², 靳婉君^{1,3}, 赖 晶^{1,3}, 倪 琳^{1,3}, 张明童^{1,3}, 李冬华^{1,3*}

1. 甘肃省药品检验研究院, 甘肃 兰州 730000

2. 甘肃省中医药大学药学院, 甘肃 兰州 730000

3. 国家中药材及饮片质量控制重点实验室, 甘肃省中藏药检验检测技术工程实验室, 甘肃 兰州 730000

摘要: **目的** 建立一测多评法同时测定大活络丸中 16 种挥发性成分 [柠檬烯、桉油精、异龙脑、龙脑、苯甲酸、乙酸辛酯、5-羟甲基糠醛、丁香酚、肉桂酸、香草醛、甲基丁香酚、广藿香酮、百秋李醇、 α -香附酮、(E)-藁本内酯、麝香酮] 的含量。**方法** 采用 HP-5 毛细管柱 (30 m $\times$ 0.32 mm $\times$ 0.25 μ m); FID 检测器; 程序升温; 进样口温度为 230 $^{\circ}$ C; 检测器温度为 250 $^{\circ}$ C; 分流比为 20:1; 色谱柱体积流量 1 mL/min。以龙脑为内参物, 建立其与 15 种挥发性成分的相对校正因子, 计算各待测组分的含量, 比较外标法和一测多评法这 2 种方法的差异。**结果** 一测多评法测得的结果与外标法测得的结果无显著性差异 (RSD $<$ 5.0%)。**结论** 建立大活络丸中 16 种挥发性成分的一测多评法, 该方法简便可行, 能较好地体现大活络丸中挥发性成分的整体性和差异性, 可为大活络丸的质量控制提供依据。

关键词: 大活络丸; 一测多评; 气相色谱法; 挥发性成分; 柠檬烯; 桉油精; 异龙脑; 龙脑; 苯甲酸; 乙酸辛酯; 5-羟甲基糠醛; 丁香酚; 肉桂酸; 香草醛; 甲基丁香酚; 广藿香酮; 百秋李醇; α -香附酮; (E)-藁本内酯; 麝香酮

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2024)17-5832-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.17.010

Simultaneous determination of 16 volatile components in Dahuoluo Pills by QAMS

LIN Ruili^{1,3}, LIU Kangkang², JIN Wanjuan^{1,3}, LAI Jing^{1,3}, NI Lin^{1,3}, ZHANG Mingtong^{1,3}, LI Donghua^{1,3}

1. Gansu Institute for Drug Control, Lanzhou 730000, China

2. School of Pharmacy, Gansu University of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China

3. State Key Laboratory of Quality Control of Chinese Medicinal Materials and Decoction Pieces, Gansu Engineering Laboratory of Chinese and Tibetan Medicine Inspection and Testing Technology, Lanzhou 730000, China

Abstract: Objective To establish a quantitative analysis of multi-components by single-marker (QAMS) method for simultaneously determining the content of 16 volatile components [limonene, eucalyptol, isoborneol, borneol, benzoic acid, acetic acid octyl ester, 5-hydroxymethylfurfural, eugenol, cinnamic acid, vanillin, methyleugenol, dhelwangenin, patchouli alcohol, α -cyperone, (E)-ligustilide, muscone] in Dahuoluo Pills (大活络丸). **Methods** Using HP-5 capillary column (30 m $\times$ 0.32 mm $\times$ 0.25 μ m); FID detector; Program heating up; The inlet temperature was 230 $^{\circ}$ C; The detector temperature was 250 $^{\circ}$ C; The diversion ratio was 20:1; Column flow rate was 1 mL/min. Using borneol as an internal reference, establish its relative correction factors with 15 volatile components, calculate the content of each tested component, and compare the differences between the external standard method and the method of QAMS. **Results** There was no significant difference (RSD $<$ 5.0%) between the results obtained by the method of QAMS and the results obtained by the external standard method. **Conclusion** The method of QAMS was established for 16 volatile components in Dahuoluo Pills. This method is simple and feasible, and can better reflect the overall and differential characteristics of volatile components in Dahuoluo Pills. It can provide a basis for quality control of Dahuoluo Pills.

Key words: Dahuoluo Pills; QAMS (quantitative analysis of multi-components by single-marker); GC (gas chromatography method);

收稿日期: 2024-03-20

基金项目: 国家中药材及饮片质量控制重点实验室项目 (2023GSMMPA-KL05)

作者简介: 蔺瑞丽 (1993—), 女, 初级药师, 主要从事中药材及中成药检验、科研和标准起草等工作。

Tel: 18368910989 E-mail: 18368910989@163.com

*通信作者: 李冬华, 主任药师, 主要从事中药质量分析与标准提高等工作, E-mail: 987601412@qq.com

volatile components; limonene; eucalyptol; isoborneol; borneol; benzoic acid; acetic acid octyl ester; 5-hydroxymethylfurfural; eugenol; cinnamic acid; vanillin; methyleugenol; dhelwangan; patchouli alcohol; α -cyperone; (*E*)-ligustilide; muscone

大活络丸处方来源于明代《经验良方》^[1-2], 主要由蕲蛇、乌梢蛇、威灵仙、天麻、全蝎、地龙、制草乌、肉桂、细辛、麻黄、羌活、防风、松香、广藿香、豆蔻、僵蚕(炒)、天南星(制)、牛黄、乌药、木香、沉香、丁香、青皮、香附(醋制)、安息香、冰片、黄连、黄芩、绵马贯众、葛根、大黄、红参、熟地、何首乌、龟甲(醋淬)、玄参、甘草、白术、当归、骨碎补(烫, 去毛)、两头尖、赤芍、没药(制)、乳香、血竭、水牛角、豹骨(油酥)、麝香等 48 味中药组成^[3]。具有祛风止痛、除湿豁痰、舒筋活络的功效, 适用于中风痰厥引起的瘫痪、足萎痹痛、筋脉拘急、腰腿疼痛及跌打损伤、行走不便、胸痹等症^[4]。生产至今已有 300 余年的历史^[5-7]。

目前, 大活络丸(大蜜丸)的执行标准多为卫生部药品标准中药成方制剂第六册 WS3-B-1082-92^[8], 该标准已经执行多年, 仅有简单的丸剂通则检查, 并不能对其质量进行有效地控制。大活络丸(小蜜丸)的现有标准是由国家食品药品监督管理局批准的编号为 YBZ01252009 的标准, 检查项有酯型生物碱检查和马兜铃酸 A 的检查, 含量测定项下总生物碱的含量测定, 缺少有效成分的控制, 无法保证药品安全有效可控, 且大活络丸处方中树脂类药材有乳香、沉香、没药、安息香、血竭、松香、乌药等, 含挥发油的药材有麝香、羌活、肉桂、细辛、没药、豆蔻、当归等, 含挥发性成分的药材有广藿香、丁香、豆蔻、冰片等。但现有的标准均未对挥发性成分进行控制。已有文献报道的挥发性成分含量测定研究也仅以麝香酮、龙脑、异龙脑、丁香酚 4 个代表性成分作为指标^[9-10], 难以全面评价大活络丸的质量, 且均为外标法(external standard method, ESM)。由于 ESM 测定对对照品的需求量大, 如龙脑、麝香酮等对照品的价格也较高, 检测成本较高, 限制了大活络丸多指标质量控制的建立。

一测多评法(quantitative analysis of multi-components by single marker, QAMS)是基于中药同类有效成分间可能存在内在关系和规律性, 利用有效成分内在的函数关系和比例关系, 通过单一成分来获得多个成分的同步定量结果的中药质量评价方法^[11-12]。已广泛应用到中药材及饮片、中药提取物及成方制剂的质量控制^[13-21], 目前未见大活络丸一

测多评法的相关研究报道。因此, 本实验参照《中国药典》和文献报道, 建立 QAMS 法同时测定大活络丸中柠檬烯、桉油精、异龙脑、龙脑、苯甲酸、乙酸辛酯、5-羟甲基糠醛、丁香酚、肉桂酸、香草醛、甲基丁香酚、广藿香酮、百秋李醇、 α -香附酮、(*E*)-藁本内酯、麝香酮等 16 种成分的含量, 以期为进一步提高该制剂的质量标准提供参考。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Agilent 8890 型气相色谱仪、Agilent 8890 型氢火焰离子化检测器, 美国安捷伦公司; SECURA125-1CN 型十万分之一分析天平、QUINTIX224-1CN 型万分之一分析天平, 瑞士梅特勒-托利多集团; KQ-300DB 型数控超声波清洗器, 昆山市超声仪器有限公司。

1.2 试剂与药物

对照品柠檬烯(批号 100470-2015030, 质量分数 96.0%)、桉油精(批号 110788-201707, 质量分数 100.0%)、异龙脑(批号 111512-202205, 质量分数 98.7%)、龙脑(批号 110881-201709, 质量分数 99.6%)、乙酸辛酯(批号 111671-201403, 质量分数 99.6%)、苯甲酸(批号 100419-201703, 质量分数 99.9%)、5-羟甲基糠醛(批号 111626-201912, 质量分数 99.2%)、丁香酚(批号 110725-201917, 质量分数 99.1%)、肉桂酸(批号 110786-201604, 质量分数 98.8%)、香草醛(批号 100491-201902, 质量分数 99.2%)、百秋李醇(批号 110772-201608, 质量分数 99.8%)、 α -香附酮(批号 110748-201815, 质量分数 99.7%)、广藿香酮(批号 111822-201904, 质量分数 100.0%)、麝香酮(批号 110719-202117, 质量分数 99.2%)、(*E*)-藁本内酯(批号 111737-201608, 质量分数 100.0%)、甲基丁香酚(批号 111642-200301, 质量分数 100.0%), 均购自中国食品药品检定研究院; 10 批次市售大活络丸样品信息见表 1。三氯甲烷, 色谱纯, 美国默克集团; 无水乙醇、醋酸乙酯、甲醇, 分析纯, 国药集团有限公司。

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 对照品溶液的制备 精密称取对照品柠檬烯 22.14 mg、桉油精 9.33 mg、异龙脑 9.42 mg、龙脑

表 1 10 批大活络丸样品信息

Table 1 Information on 10 batches of Dahuoluo Pills samples

编号	生产批号	生产厂家	有效期/年	包装材料
X1	220703	吉林市鹿王制药股份有限公司	4	蜡丸
X2	220507	吉林市鹿王制药股份有限公司	4	蜡丸
X3	220606	吉林市鹿王制药股份有限公司	4	蜡丸
X4	220308	青海宝鉴堂国药有限公司	3	铝箔纸
X5	220810	青海宝鉴堂国药有限公司	3	铝箔纸
X6	220904	青海宝鉴堂国药有限公司	3	铝箔纸
X7	220905	葫芦岛国帝药业有限责任公司	2	铝塑包装
X8	221107	葫芦岛国帝药业有限责任公司	2	铝塑包装
X9	221105	葫芦岛国帝药业有限责任公司	2	铝塑包装
X10	220912	葫芦岛国帝药业有限责任公司	2	铝塑包装

10.26 mg、苯甲酸 50.16 mg、乙酸辛酯 51.76 mg、5-羟甲基糠醛 23.98 mg、丁香酚 77.87 mg、肉桂酸 72.80 mg、香草醛 21.70 mg、甲基丁香酚 76.79 mg、广藿香酮 15.74 mg、百秋李醇 27.84 mg、 α -香附酮 24.90 mg、(E)-藁本内酯 43.14 mg、麝香酮 22.78 mg，分别置于 10 mL 棕色量瓶中，用三氯甲烷溶解，定容配制成储备液；分别精密吸取上述各储备液适量配制成含柠檬烯 106.3 $\mu\text{g/mL}$ 、桉油精 93.3 $\mu\text{g/mL}$ 、异龙脑 116.2 $\mu\text{g/mL}$ 、龙脑 102.2 $\mu\text{g/mL}$ 、苯甲酸 100.2 $\mu\text{g/mL}$ 、乙酸辛酯 103.1 $\mu\text{g/mL}$ 、5-羟甲基糠醛 95.2 $\mu\text{g/mL}$ 、丁香酚 192.9 $\mu\text{g/mL}$ 、肉桂酸 107.9 $\mu\text{g/mL}$ 、香草醛 107.6 $\mu\text{g/mL}$ 、甲基丁香酚 96.0 $\mu\text{g/mL}$ 、广藿香酮 78.7 $\mu\text{g/mL}$ 、百秋里醇 69.5 $\mu\text{g/mL}$ 、 α -香附酮 99.3 $\mu\text{g/mL}$ 、(E)-藁本内酯 107.9 $\mu\text{g/mL}$ 、麝香酮 113.0 $\mu\text{g/mL}$ 的混合对照品溶液。

2.1.2 供试品溶液的制备 取大活络丸样品适量，粉碎，精密称取样品 10 g，置于锥形瓶中，精密加入三氯甲烷 25 mL，称定质量，静置 1 h，静置过程中时时振摇，超声处理 30 min，再称定质量，用三氯甲烷补足减失的质量，摇匀，滤过，取续滤液，即得供试品溶液。

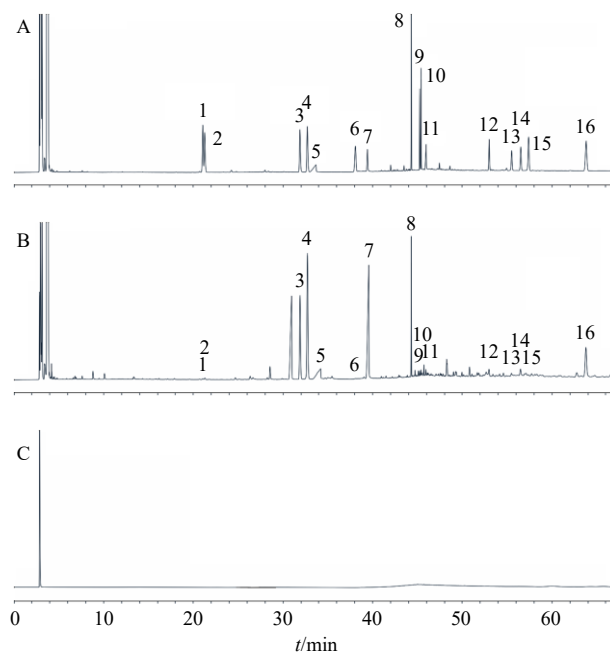
2.2 色谱条件与系统适用性试验

交联 5%苯基甲基聚硅氧烷为固定相的 Agilent HP-5 毛细管柱（货号 19091J-416，30 m $\times$ 0.32 mm $\times$ 0.25 μm ）；程序升温：初始温度 50 $^{\circ}\text{C}$ ，保持 10 min，以 5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 的速率升温至 70 $^{\circ}\text{C}$ ，保持 10 min，以 5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 的速率升温至 90 $^{\circ}\text{C}$ ，保持 10 min，以 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 的速率升温至 160 $^{\circ}\text{C}$ ，保持 40 min；进样口温度为 230 $^{\circ}\text{C}$ ，检测器温度为 250 $^{\circ}\text{C}$ ；分流比

为 20:1；载气为氦气。色谱柱体积流量 1 mL/min。

2.3 方法学验证

2.3.1 专属性试验 取空白溶液、对照品溶液、供试品溶液适量，在“2.2”项下色谱条件进样测定，结果见图 1。由此可知，挥发性成分理论塔板数按龙脑计大于 10 000，空白无干扰，表明该方法专属性良好。



1-柠檬烯；2-桉油精；3-异龙脑；4-龙脑；5-苯甲酸；6-乙酸辛酯；7-5-羟甲基糠醛；8-丁香酚；9-香草醛；10-甲基丁香酚；11-肉桂酸；12-百秋李醇；13-广藿香酮；14-(E)-藁本内酯；15- α -香附酮；16-麝香酮。

1-limonene；2-eucalyptol；3-isoborneol；4-borneol；5-benzoic acid；6-acetic acid octyl ester；7-5-hydroxymethylfurfural；8-eugenol；9-cinnamic acid；10-vanillin；11-methyleugenol；12-dihelwangin；13-patchouli alcohol；14- α -cyperone；15-(E)-ligustilide；16-muscone。

图 1 混合对照品溶液 (A)、大活络丸供试品溶液 (B)、空白溶液 (C)

Fig. 1 Mixed reference substances solution (A), Dahuoluo Pills test solution (B), blank solution (C)

2.3.2 线性关系考察 精密吸取“2.1.1”项下混合对照品溶液适量，稀释成 5 个不同的质量浓度，在“2.2”项下色谱条件进样测定。以对照品质量浓度为横坐标 (X)，峰面积为纵坐标 (Y) 进行线性回归，得回归方程，并以信噪比 (S/N) 10:1 为定量限，S/N 3:1 为检出限，结果见表 2，可知各成分在各自范围内线性关系良好。

2.3.3 精密度试验 取大活络丸样品 X1 适量，按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液，在“2.2”项下色谱条件进样测定 6 次，每次 1 μL ，测得柠檬烯、

表 2 大活络丸中 16 种挥发性成分线性关系考察结果

Table 2 Results of linear relationship study on 16 volatile components in Dahualuo Pills

成分	线性回归方程	R ²	线性范围/(μg·mL ⁻¹)	定量限/(ng·mL ⁻¹)	检出限/(ng·mL ⁻¹)
柠檬烯	Y=3 591.8 X+1.182 9	0.996 2	5.314~106.272	53.1	26.6
桉油精	Y=3 631.5 X+3.547 6	0.999 7	4.665~93.300	46.7	23.4
异龙脑	Y=3 181.9 X+0.497 8	0.996 1	5.811~116.219	58.1	29.1
龙脑	Y=4 094.6 X+0.005 2	0.996 1	5.109~102.190	51.1	25.6
苯甲酸	Y=2 006.2 X-5.732 0	0.995 3	5.011~100.220	50.1	25.1
乙酸辛酯	Y=2 797.6 X+0.274 6	0.995 9	5.155~103.106	51.6	25.8
5-羟甲基糠醛	Y=1 666.4 X-0.462 9	0.996 3	4.758~95.153	47.6	23.8
丁香酚	Y=2 776.9 X+0.524 9	0.996 2	9.646~192.923	96.5	48.3
香草醛	Y=2 041.7 X+0.782 6	0.996 1	5.382~107.632	53.8	26.9
甲基丁香酚	Y=2 837.8 X+2.082 1	0.995 7	4.799~95.988	48.0	24.0
肉桂酸	Y=1 686.6 X-5.062 8	0.995 0	5.394~107.890	53.9	27.0
百秋李醇	Y=2 980.9 X+0.355 6	0.996 1	3.473~69.461	34.7	17.4
广藿香酮	Y=2 141.4 X+0.696 8	0.996 0	3.935~78.700	39.4	19.7
(E)-藁本内酯	Y=1 877.6 X+0.289 6	0.996 4	5.393~107.850	53.9	27.0
α-香附酮	Y=3 328.4 X-0.172 5	0.995 8	4.965~99.301	49.7	24.9
麝香酮	Y=3 549.8 X-0.060 2	0.995 8	5.649~112.989	56.5	28.3

桉油精、异龙脑、龙脑、苯甲酸、乙酸辛酯、5-羟甲基糠醛、丁香酚、香草醛、甲基丁香酚、肉桂酸、百秋李醇、广藿香酮、(E)-藁本内酯、α-香附酮、麝香酮峰面积 RSD 分别为 2.30%、1.52%、1.37%、1.59%、0.92%、2.56%、1.63%、1.69%、1.83%、0.76%、1.05%、1.18%、2.78%、1.23%、1.75%、1.02%，表明仪器精密度良好。

2.3.4 稳定性试验 取大活络丸样品 X1 适量，按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液，置于 25℃下，分别于 0、9、18、27、36 h，在“2.2”项下色谱条件进样测定，测得柠檬烯、桉油精、异龙脑、龙脑、苯甲酸、乙酸辛酯、5-羟甲基糠醛、丁香酚、香草醛、甲基丁香酚、肉桂酸、百秋李醇、广藿香酮、(E)-藁本内酯、α-香附酮、麝香酮峰面积 RSD 分别为 1.07%、1.60%、0.70%、0.40%、0.57%、1.46%、0.09%、0.46%、2.46%、0.82%、0.35%、0.80%、0.35%、0.80%、0.74%、1.14%，表明该供试品溶液在 36 h 内稳定性良好。

2.3.5 重复性试验 取大活络丸样品 X1 适量，平行称取 6 份样品，按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液，在“2.2”项下色谱条件进样测定，每份样品进样 1 针，每次 1 μL，测得柠檬烯、桉油精、异龙脑、龙脑、苯甲酸、乙酸辛酯、5-羟甲基糠醛、丁香酚、香草醛、甲基丁香酚、肉桂酸、百秋李醇、广

藿香酮、(E)-藁本内酯、α-香附酮、麝香酮质量分数的 RSD 分别为 1.84%、1.12%、0.18%、0.08%、0.33%、1.76%、0.11%、0.63%、0.59%、2.15%、1.89%、0.20%、0.38%、0.16%、0.66%、0.43%，表明该试验重复性良好。

2.3.6 加样回收率试验 分别精密吸取“2.1.1”项下对照品储备溶液适量，配制成含柠檬烯 0.425 μg/mL、桉油精 1.791 μg/mL、异龙脑 180.864 μg/mL、龙脑 236.390 μg/mL、苯甲酸 1.156 μg/mL、乙酸辛酯 29.814 μg/mL、5-羟甲基糠醛 575.520 μg/mL、丁香酚 104.657 μg/mL、肉桂酸 5.870 μg/mL、香草醛 24.998 μg/mL、甲基丁香酚 5.898 μg/mL、广藿香酮 30.221 μg/mL、百秋里醇 26.726 μg/mL、α-香附酮 15.298 μg/mL、(E)-藁本内酯 127.625 μg/mL、麝香酮 6.968 μg/mL 的混合对照品溶液。

称取各成分含量已测定的大活络丸 X1 样品 6 份，精密称定，置于 25 mL 量瓶中，按各成分含量 100%的比例精密吸取上述混合对照品溶液 2.5 mL，按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液，在“2.2”项下色谱条件进样测定，计算加样回收率。结果柠檬烯、桉油精、异龙脑、龙脑、苯甲酸、乙酸辛酯、5-羟甲基糠醛、丁香酚、香草醛、甲基丁香酚、肉桂酸、百秋李醇、广藿香酮、(E)-藁本内酯、α-香附酮、麝香酮平均加样回收率分别为 105.14%、103.66%、

100.45%、100.54%、100.29%、104.17%、100.25%、100.19%、100.60%、101.07%、100.12%、100.91%、100.36%、100.39%、100.40%、99.82%，RSD 分别为 0.29%、0.36%、0.16%、0.14%、0.19%、0.20%、0.21%、0.36%、0.28%、0.33%、0.17%、0.29%、0.41%、0.33%、0.21%、0.38%，表明该方法的准确度良好。

2.4 QAMS 法相对校正因子 (f_{is}) 的计算

在一定的线性范围，待测成分的量与检测器响应成正比，以多个质量浓度下 f_{is} 的平均值作为该待测成分的 f_{is} 。本研究采用“2.3.2”项下线性关系考察中不同梯度的混合对照品溶液的质量浓度和色谱

峰峰面积，以大活络丸中含量较高的龙脑为内参物，运用公式 $f_{is}=f_i/f_s=(A_i/C_i)/(A_s/C_s)=A_iC_s/A_sC_i$ （其中 C 和 A 分别代表质量浓度和峰面积， i 和 s 分别代表待测成分和内参物）计算各成分的 f_{is} ，并计算其平均值，结果见表 3，柠檬烯、桉油精、异龙脑、苯甲酸、乙酸辛酯、5-羟甲基糠醛、丁香酚、香草醛、甲基丁香酚、肉桂酸、百秋李醇、广藿香酮、(E)-藁本内酯、 α -香附酮、麝香酮相对于内参物龙脑的 f_{is} 分别为 0.892、0.893、0.784、0.481、0.688、0.400、0.682、0.507、0.705、0.407、0.737、0.527、0.464、0.810、0.871，RSD 分别为 0.92%、0.80%、0.83%、

表 3 各组分的 f_{is}
Table 3 f_{is} values of each component

进样体积/ μ L	f 柠檬烯/	f 桉油精/	f 异龙脑/	f 苯甲酸/	f 乙酸辛酯/	f 5-羟甲基	f 丁香酚/	f 香草醛/	f 甲基丁	f 肉桂酸/	f 百秋李醇/	f 广藿香酮/	f (E)-藁本	f α -香附酮/	f 麝香酮/
	龙脑	龙脑	龙脑	龙脑	龙脑	糠醛/龙脑	龙脑	龙脑	香酚/龙脑	龙脑	龙脑	龙脑	内酯/龙脑	龙脑	龙脑
1	0.879	0.885	0.778	0.478	0.684	0.406	0.679	0.500	0.698	0.402	0.729	0.526	0.459	0.813	0.868
2	0.888	0.885	0.781	0.477	0.683	0.405	0.681	0.504	0.705	0.404	0.732	0.527	0.462	0.808	0.861
3	0.896	0.896	0.781	0.488	0.688	0.397	0.682	0.507	0.699	0.405	0.732	0.522	0.459	0.814	0.864
4	0.899	0.898	0.789	0.482	0.690	0.397	0.681	0.511	0.705	0.410	0.741	0.520	0.462	0.810	0.868
5	0.897	0.900	0.794	0.479	0.697	0.394	0.689	0.511	0.717	0.416	0.751	0.540	0.477	0.807	0.893
f_{is} 平均值	0.892	0.893	0.784	0.481	0.688	0.400	0.682	0.507	0.705	0.407	0.737	0.527	0.464	0.810	0.871
RSD/%	0.92	0.80	0.83	0.90	0.83	1.29	0.59	0.93	1.08	1.35	1.21	1.53	1.61	0.38	1.46

0.90%、0.83%、1.29%、0.59%、0.93%、1.08%、1.35%、1.21%、1.53%、1.61%、0.38%、1.46%，均小于 2.0%，表明 f_{is} 的重复性良好。

2.5 f_{is} 耐用性考察

2.5.1 不同仪器对 f_{is} 的影响 采用交联 5%苯基甲基聚硅氧烷为固定相的 HP-5 毛细管柱 (30 m $\times$ 0.32 mm $\times$ 0.25 μ m)，分别考察了 Agilent 8890、Agilent 7890 和岛津 Nexis GC-2030 3 种气相色谱系统对上述 15 种成分 f_{is} 的影响。分别取“2.1.1”项下的混合对照品溶液，按“2.2”项下气相色谱条件进样 6 针进行分析，结果见表 4，柠檬烯、桉油精、异龙

脑、苯甲酸、乙酸辛酯、5-羟甲基糠醛、丁香酚、香草醛、甲基丁香酚、肉桂酸、百秋李醇、广藿香酮、(E)-藁本内酯、 α -香附酮、麝香酮的 f_{is} 的 RSD 为 0.61%~1.62%，均小于 2.0%，表明不同品牌的检测仪器对各成分 f_{is} 影响较小，重现性良好。

2.5.2 不同色谱柱对 f_{is} 的影响 采用 Agilent 8890 气相色谱仪考察了 Agilent HP-5 (30 m $\times$ 0.32 mm $\times$ 0.25 μ m，货号 19091J-413)、Agilent HP-5 (60 m $\times$ 0.32 mm $\times$ 0.25 μ m，货号 19091J-416) 和赛默飞 TG-5MS (30 m $\times$ 0.25 mm $\times$ 0.25 μ m，货号 26097-1420) 3 种固定相相同的毛细管柱对各成分 f_{is} 的影响，分

表 4 不同仪器对 f_{is} 的影响
Table 4 Effect of different instruments on f_{is}

仪器	f 柠檬烯/	f 桉油精/	f 异龙脑/	f 苯甲酸/	f 乙酸辛酯/	f 5-羟甲基	f 丁香酚/	f 香草醛/	f 甲基丁	f 肉桂酸/	f 百秋李醇/	f 广藿香酮/	f (E)-藁本	f α -香附酮/	f 麝香酮/
	龙脑	龙脑	龙脑	龙脑	龙脑	糠醛/龙脑	龙脑	龙脑	香酚/龙脑	龙脑	龙脑	龙脑	内酯/龙脑	龙脑	龙脑
Agilent 8890	0.879	0.885	0.778	0.478	0.684	0.406	0.679	0.500	0.698	0.402	0.729	0.526	0.459	0.813	0.868
Agilent 7890	0.888	0.885	0.781	0.477	0.683	0.405	0.681	0.504	0.705	0.404	0.732	0.527	0.462	0.808	0.861
岛津 Nexis GC-2030	0.901	0.899	0.792	0.489	0.691	0.412	0.698	0.516	0.718	0.411	0.738	0.538	0.469	0.821	0.879
f_{is} 平均值	0.889	0.890	0.784	0.481	0.686	0.407	0.686	0.507	0.707	0.406	0.733	0.530	0.463	0.814	0.869
RSD/%	1.23	0.91	0.94	1.37	0.63	0.98	1.52	1.62	1.41	1.17	0.61	1.26	1.10	0.80	1.03

表 7 QAMS 法与 EMS 法测定 10 批大活络丸中 16 种挥发性成分的含量测定结果

Table 7 Determination results of 16 volatile components in 10 batches of Dahuoluo Pills by QAMS and EMS methods

样品	柠檬烯/ ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)		RSD/ %	桉油精/ ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)		RSD/ %	异龙脑/ ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)		RSD/ %	苯甲酸/ ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)		RSD/ %	乙酸辛酯/ ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)		RSD/ %	龙脑/ ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)
	EMS	QAMS		EMS	QAMS		EMS	QAMS		EMS	QAMS		EMS	QAMS		
X1	0.173	0.180	4.04	1.056	1.066	0.97	99.938	101.441	1.48	14.329	14.656	2.23	0.487	0.491	0.87	118.436
X2	0.147	0.151	2.81	0.958	0.954	-0.38	82.917	82.996	0.09	8.280	8.351	0.85	0.574	0.571	-0.58	93.547
X3	0.077	0.078	1.69	1.019	1.001	-1.81	88.984	87.817	-1.33	47.996	47.729	-0.56	0.651	0.639	-1.92	102.969
X4	0.442	0.451	2.00	1.567	1.553	-0.93	86.684	86.323	-0.42	8.509	8.539	0.35	0.591	0.586	-0.93	97.338
X5	0.364	0.377	3.39	1.211	1.217	0.47	86.589	87.444	0.98	11.930	12.140	1.73	0.705	0.708	0.38	98.200
X6	0.181	0.185	2.17	0.617	0.612	-0.86	100.536	100.147	-0.39	23.242	23.329	0.37	0.404	0.400	-1.08	114.979
X7	0.206	0.210	1.90	0.546	0.542	-0.82	58.348	58.152	-0.34	10.054	10.097	0.43	0.419	0.415	-0.87	65.228
X8	0.385	0.400	3.84	0.320	0.323	0.95	76.707	77.782	1.38	21.677	22.148	2.13	0.587	0.592	0.78	93.746
X9	0.269	0.278	3.30	0.351	0.351	0.11	81.474	82.039	0.69	16.569	16.811	1.44	0.574	0.574	0.03	99.780
X10	0.202	0.209	3.49	0.919	0.925	0.61	91.037	92.016	1.06	14.400	14.666	1.81	1.104	1.109	0.46	115.807

样品	5-羟甲基糠 醛/($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)		RSD/ %	丁香酚/ ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)		RSD/ %	香草醛/ ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)		RSD/ %	甲基丁香 酚/($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)		RSD/ %	肉桂酸/ ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)		RSD/ %		
	EMS	QAMS		EMS	QAMS		EMS	QAMS		EMS	QAMS		EMS	QAMS			
X1	271.027	275.805	1.73	51.097	51.570	0.92	3.087	3.097	0.33	2.716	2.721	0.18	13.068	13.226	1.20		
X2	189.615	190.281	0.35	57.884	57.610	-0.48	2.610	2.583	-1.06	4.904	4.844	-1.24	9.318	9.300	-0.20		
X3	315.238	311.898	-1.07	52.686	51.699	-1.91	5.942	5.796	-2.51	4.317	4.205	-2.68	12.246	12.050	-1.63		
X4	152.375	152.128	-0.16	66.391	65.738	-0.99	2.606	2.566	-1.56	3.937	3.870	-1.74	3.828	3.800	-0.72		
X5	276.201	279.642	1.23	49.337	49.541	0.41	2.848	2.843	-0.18	2.747	2.738	-0.34	9.389	9.454	0.69		
X6	40.547	40.493	-0.13	18.780	18.601	-0.96	2.641	2.600	-1.56	2.306	2.267	-1.73	7.481	7.431	-0.68		
X7	199.118	198.957	-0.08	17.455	17.298	-0.91	2.778	2.737	-1.49	2.060	2.026	-1.67	3.187	3.167	-0.65		
X8	99.987	101.646	1.63	57.762	58.238	0.82	3.064	3.071	0.23	2.391	2.393	0.07	10.785	10.904	1.09		
X9	94.279	95.176	0.94	57.320	57.390	0.12	3.121	3.107	-0.46	2.794	2.776	-0.65	13.729	13.785	0.40		
X10	257.886	261.327	1.32	51.542	51.800	0.50	3.356	3.353	-0.09	2.520	2.513	-0.26	16.314	16.442	0.78		

样品	百秋李醇/ ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)		RSD/ %	广藿香酮/ ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)		RSD/ %	(E)-藁本内 酯/($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)		RSD/ %	α -香附酮/ ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)		RSD/ %	麝香酮/ ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)		RSD/ %		
	EMS	QAMS		EMS	QAMS		EMS	QAMS		EMS	QAMS		EMS	QAMS			
X1	13.318	13.465	1.09	7.791	7.885	1.20	14.960	15.086	0.84	3.484	3.514	0.84	63.810	64.437	0.97		
X2	12.270	12.234	-0.29	7.571	7.556	-0.19	12.816	12.746	-0.55	2.627	2.613	-0.55	51.905	51.687	-0.42		
X3	14.953	14.700	-1.72	6.023	5.927	-1.62	14.515	14.232	-1.99	4.315	4.230	-2.00	58.117	57.061	-1.85		
X4	11.843	11.747	-0.81	7.414	7.362	-0.70	12.884	12.747	-1.08	4.556	4.507	-1.08	46.885	46.449	-0.94		
X5	14.210	14.295	0.59	6.265	6.309	0.70	13.488	13.533	0.33	0.793	0.796	0.33	58.037	58.310	0.47		
X6	1.328	1.318	-0.77	4.339	4.310	-0.68	13.631	13.490	-1.05	0.689	0.682	-1.10	53.905	53.421	-0.91		
X7	1.315	1.306	-0.72	3.581	3.559	-0.63	14.327	14.187	-0.99	1.118	1.107	-1.00	36.212	35.905	-0.85		
X8	15.528	15.684	0.99	6.575	6.649	1.11	15.023	15.134	0.74	0.798	0.804	0.71	47.741	48.161	0.87		
X9	14.787	14.831	0.30	7.347	7.377	0.41	15.453	15.459	0.04	0.791	0.791	0.02	54.600	54.697	0.18		
X10	20.011	20.148	0.68	6.352	6.402	0.79	15.816	15.883	0.42	2.524	2.534	0.39	56.365	56.679	0.55		

果发现三氯甲烷中能够溶出更多的挥发性成分。同时还考察了不同超声时间 30、60、90 min，发现 30 min 和 60 min 时溶出的挥发性成分无显著性差异，且 90 min 时三氯甲烷挥发明显，故选择超声 30 min，

并在超声后补足减失的质量。最后考察了不同料液比 10:20、10:25、10:30, 发现料液比 10:25 时各待测成分具有较好的峰型和分离度, 故选择料液比为 10:25。综合以上考察结果, 最终选择三氯甲烷作为提取溶剂, 以 10:25 料液比超声 30 min 制备供试品溶液。

3.2 色谱条件和系统适应性考察

试验过程中对起始温度、升温速率和运行时间、柱流速等色谱条件进行了考察, 最终选择起始温度 50 °C、以 5 °C/min 的速率升温、体积流量为 1 mL/min 时色谱峰分离较好, 且样品洗脱较为完全。其中 1 和 2 号峰、9 和 10 号峰之间的分离度较低, 均小于 1.5, 但同批次样品精密度、重复性和稳定性的测定结果 RSD 小于 3%, 相对稳定, 故在初步研究过程中计算含量时, 将这几个成分考虑在内, 但在后期研究成熟后, 制定标准时, 拟将此 4 个成分作为定性指标, 以此判断企业是否投料相对应药材羌活、豆蔻、安息香、细辛的依据。

3.3 内参物选择

依据 QAMS 法技术指南要求^[1], 本实验选用龙脑作为内参物, 是因为龙脑是大活络丸处方中冰片的主要有效成分, 且在各批次大活络丸样品中稳定存在, 含量较高, 故选择龙脑作为内参物。

3.4 测量结果分析

通过对 3 个厂家 10 批次样品的检测结果发现, 各厂家不同成分的含量差异较大, 尤其是峰 7 (5-羟甲基糠醛)、9 (香草醛)、10 (甲基丁香酚) 和 12 (百秋李醇), 表明不同厂家、不同批次间的样品差异较大, 统计分析 3 个厂家 10 批次样品的生产日期、有效期和包装材料, 发现各厂家样品包装也各不相同, 主要分为铝箔纸和蜡丸两种包装形式, 发现生产日期接近的样品, 铝箔纸包装产品挥发性成分含量低于蜡丸包装。

同一厂家不同批次样品, 生产日期越新, 其挥发性成分含量越高, 表明尽管有外包装和蜡丸密封保护, 但随着保存时间增加, 挥发性成分还是会降低。3 个厂家的保质期也不一致, 2、3、4 年不等。为保证大活络丸药品的疗效, 建议各厂家应对药品保质期、包装材料做进一步研究, 选择适宜的保质期和包装方式, 避免有效成分的损失。

4 结论

本实验以龙脑为内参物, 建立该成分与柠檬烯、桉油精、异龙脑、苯甲酸、乙酸辛酯、5-羟甲基糠

醛、丁香酚、香草醛、甲基丁香酚、肉桂酸、百秋李醇、广藿香酮、藁本内脂、 α -香附酮、麝香酮等 15 种成分的相对保留时间和 $f_{i/s}$, 并通过 $f_{i/s}$ 的换算, 实现了只需龙脑对照品, 即可通过 QAMS 法对大活络丸中对 16 种挥发性成分进行同步含量测定。方法学考察结果表明, 所建立方法的重复性和准确度良好, QAMS 测定结果在不同品牌气相色谱仪及不同品牌石英毛细管柱上得到了较好的验证, 方法重现性好, 且 16 个活性成分的出峰顺序均不受色谱系统的影响, 符合 QAMS 技术指南的要求。通过 10 批次样品的验证, 外标法含量测定结果与内标法所测结果无显著差异, 该方法简便准确, 可用于大活络丸挥发性成分的快速测定, 为大活络丸多成分质量控制模式提供了新方法。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 王欣美, 王枚博, 吴赵云, 等. 大活络丸的质量标准研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(14): 145-149.
- [2] 张晓娟. 大活络丸质量评价性研究 [D]. 张家口: 河北北方学院, 2016.
- [3] 国家药品监督管理局《国家药品标准》中成药地方标准上升国家标准部分, 经络肢体脑系分册 [S]. 2002: 184.
- [4] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 149.
- [5] 何轶, 鲁静, 张聿梅, 等. 大活络丸中贵细药的质量控制研究 [J]. 药物分析杂志, 2016, 36(7): 1287-1292.
- [6] 郝博, 曹帅, 夏晶, 等. 大活络丸及其同系列品种中牛黄的质量分析研究 [J]. 药物分析杂志, 2016, 36(8): 1470-1475.
- [7] 李红凯, 郭慧娟, 吕霞, 等. 大活络丸近年研究概述 [J/OL]. 中华中医药学刊, (2023-06-14) [2024-08-06]. <https://kns.cnki.net/kcms2/detail/21.1546.R.20230613.1142.006.html>.
- [8] 中华人民共和国卫生部药品标准: 中药成方制剂第六册 [S]. 1992: 12.
- [9] 杨莹, 郭琪, 苗爱东, 等. 气相色谱法同时测定不同厂家大活络丸中异龙脑、龙脑和丁香酚的含量 [J]. 山西医药杂志, 2021, 50(2): 190-192.
- [10] 李志军, 路冬云, 周玉新, 等. GC 测定大活络丸中麝香酮的含量 [J]. 中国现代中药, 2017, 19(3): 436-438.
- [11] 张敏, 王芳, 刘惠娟, 等. 一测多评法在中药质量控制中的应用 [J]. 中国民族民间医药, 2021, 30(14): 51-55.
- [12] 孙越鹏, 王梦雪, 宋丹, 等. 基于一测多评多组分定量质控联合主成分分析、正交偏最小二乘法-判别分析及熵权逼近理想解排序法的盐沙苑子饮片综合质量评价 [J]. 中草药, 2023, 54(24): 8077-8085.
- [13] 林丽, 杨雯晴, 商和儒. 基于一测多评定量控制联合灰

- 色关联度分析的颈痛颗粒综合质量评价 [J]. 药物评价研究, 2023, 46(6): 1254-1263.
- [14] 郭琪, 杨莹, 雷虹. 一测多评法测定大活络丸中 6 种指标性成分的研究 [J]. 解放军药学报, 2018, 34(4): 355-358.
- [15] 孙立秋, 王丹, 赵英楠, 等. 一测多评法测定艾叶中 7 个黄酮类成分的含量 [J]. 药物分析杂志, 2024, 44(5): 806-815.
- [16] 侯丽慧, 王乐, 张宇, 等. 一测多评法测定冰川滴丸中 6 个成分含量 [J]. 中国药业, 2024, 33(10): 76-80.
- [17] 田淑芳, 韩旭, 谭奥飞, 等. 一测多评法同时测定连翘和连翘叶中多种成分 [J]. 河南大学学报: 医学版, 2024, 43(2): 96-102.
- [18] 杨海玲, 李雲妃, 刘振杰, 等. 一测多评法同时测定丁公藤不同炮制品中 7 个活性成分含量 [J]. 药物分析杂志, 2024, 44(3): 395-404.
- [19] 张富丽, 管海波, 户军燕, 等. 一测多评法联合化学计量学及熵权优劣解距离分析综合评价青钱柳药材质量 [J]. 中草药, 2024, 55(4): 1334-1343.
- [20] 冉娇洋, 王洁, 张新风, 等. “一测多评”法同时测定艾纳香药材中 6 种成分的含量 [J/OL]. 沈阳药科大学学报, (2023-12-26) [2024-08-06]. <https://doi.org/10.14066/j.cnki.cn21-1349/r.2022.0108>.
- [21] 宝艳儒, 冯贻东, 曾伟珍, 等. 指纹图谱结合一测多评法评价艾纳香药材质量 [J]. 人参研究, 2021, 33(3): 21-27.

[责任编辑 郑礼胜]