

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2021.10.016

柴胡安心胶囊挥发性成分气相色谱串联质谱指纹图谱研究*

于静¹, 陈威², 张彦景¹, 杨继章¹, 孙国祥³, 王玲娇^{1△}

(1. 河北医科大学第一医院药学部, 河北 石家庄 050031; 2. 河北医科大学药学院, 河北 石家庄 050017;
3. 沈阳药科大学药学院, 辽宁 沈阳 110016)

摘要:目的 建立柴胡安心胶囊挥发性成分的气相色谱串联质谱(GC-MS)指纹图谱。方法 色谱柱为DB-5ms毛细管柱(30 m × 0.25 mm, 0.25 μm), 载气为高纯度氦(纯度≥99.999%), 流速为1.0 mL/min, 进样口温度为250℃, 进样量为1 μL, 程序升温, 分流比为20:1, 分流进样; 电子轰击离子源, 轰击能量为70 eV, 离子源温度为230℃, 传输线温度为250℃, 溶剂延迟时间为4 min, 质荷比为55~550。采用“中药色谱指纹图谱超信息特征数字化评价系统3.0”软件, 以峰面积最大的色谱峰为参照峰, 确定共有峰; 采用系统指纹法定量判定样品质量等级; 根据美国国家标准与技术局标准质谱数据库及文献检索指认共有峰。结果 12批样品的GC-MS图谱有53个共有峰, 鉴定出44种化学成分(占总峰面积的99.57%); 10批样品质量均在良好以上, 2批样品质量为中等; 44种化学成分主要包括糠醛(22.50%)、丹皮酚(15.80%)、棕榈酸(12.33%)、桉叶油醇(4.48%)等。结论 所建立的GC-MS指纹图谱稳定、可靠, 可用于柴胡安心胶囊挥发性成分的研究及整体质量控制, 还可为后续药效学研究提供参考。

关键词:柴胡安心胶囊; 挥发性成分; 气相色谱串联质谱; 指纹图谱; 质量控制

中图分类号: R932; R284.1; R286.0

文献标志码: A

文章编号: 1006-4931(2021)10-0061-05

GC-MS Fingerprint Spectrum of Volatile Components in Chaihu Anxin Capsules

YU Jing¹, CHEN Wei², ZHANG Yanjing¹, YANG Jizhang¹, SUN Guoxiang³, WANG Lingjiao¹

(1. Department of Pharmacy, The First Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang, Hebei, China 050031; 2. College of Pharmacy, Hebei Medical University, Shijiazhuang, Hebei, China 050017; 3. College of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang, Liaoning, China 110016)

Abstract: Objective To establish a gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) fingerprint of volatile components in Chaihu Anxin Capsules. **Methods** The chromatographic column was DB-5ms capillary column (30 m × 0.25 mm, 0.25 μm), the carrier gas was high purity helium (purity ≥ 99.999%), the flow rate was 1.0 mL/min, the temperature of the sample inlet was 250℃, and the injection volume was 1 μL, temperature-programmed, the split ratio was 20:1 with split injection. The ion source was bombarded by the electron with bombardment energy of 70 eV, the temperature of ion source was 230℃, the temperature of the transmission line was 250℃, the delay time of solvent was 4 min, and the mass-load ratio was 55-550. The "Digitized Evaluation System for Super-Information Characteristics of the Traditional Chinese Medicine (TCM) Chromatographic Fingerprints 3.0" software was used to identify the common peaks with the largest peak area as the reference peak. The quality grade of the sample was determined by the systematic fingerprint quantitative method. The common peaks were identified according to the standard mass spectrometry database of the National Institute of Standards and Technology (NIST) and literature search. **Results** There were 53 common peaks in the GC-MS spectra of 12 batches of samples, and 44 chemical components were identified (accounting for 99.57% of the total peak area). The quality grades of ten batches of samples were good and two batches of samples were medium. The 44 chemical constituents mainly included furfural (22.50%), paeonol (15.80%), palmitic acid (12.33%), eucalyptol (4.48%), etc. **Conclusion** The established GC-MS fingerprint method is stable and reliable. It can be used for the research of volatile components of Chaihu Anxin Capsules, the overall quality control, and the follow-up pharmacodynamics research.

Key words: Chaihu Anxin Capsules; volatile components; GC-MS; fingerprint; quality control

柴胡安心胶囊是医院院内制剂, 有疏肝理气、镇静安神功效, 主要组方药材(如柴胡、白芍、桂枝等)富含挥发性成分, 其中柴胡的挥发性成分有解热镇痛、保护心血管作用^[1]; 白芍的挥发性成分如丹皮酚可改善脑缺血再灌注, 有抗抑郁、抗焦虑作用^[2]; 桂枝中肉桂醛的镇静、降压作用显著^[3]。该制剂处方组成中含挥发性成分的药味超总量的60%, 在制剂加工过程中, 浓缩液表面

可见含香气的油类物质层, 目前对柴胡安心胶囊的研究主要集中于极性部位^[4-5], 尚未见对该制剂挥发性成分的研究。数字化指纹图谱是以数学原理对指纹图谱的特征进行数据挖掘的数字加工过程^[6], 以多数据体现指纹图谱特征, 能全面且整体地反映中药化学成分的内在质量。本研究采用气相色谱串联质谱(GC-MS)法测定柴胡安心胶囊中挥发性成分, 并建立指纹图谱, 为阐明其抗

*基金项目: 河北省财政厅老年病防治项目[361034]; 河北省中医药局科研计划课题[2020164]; 河北医科大学第一医院“星火”青年科研项目[XH201812]。

第一作者: 于静, 女, 硕士研究生, 副主任药师, 研究方向为中药质量控制, (电话)0311-87156670(电子信箱)38565914@qq.com。

△通信作者: 王玲娇, 女, 硕士研究生, 副主任药师, 研究方向为中药质量分析, (电子信箱)327239256@qq.com。

焦虑、抗抑郁作用的药效物质基础和基于挥发性成分的质量控制提供科学依据。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

TRACE DSQ 型气相色谱串联质谱仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);Sartorius BS 110S 型分析天平(北京赛多利斯科学仪器有限公司);KQ-400KDE 型高功率数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 试剂

柴胡安心胶囊(河北医科大学第一医院,批号分别为 170813, 170826, 170901, 170914, 170928, 170834, 170841, 170855, 170935, 170959, 170968, 规格为每粒 0.5 g);试验所用试剂均为分析纯,水为纯化水。柴胡(批号为 180601CP254)、白芍(批号为 180601CP072)、龙骨(批号为 20180101)、夏枯草(批号为 20180401)、延胡索(批号为 20160901)、炙甘草(批号为 20180101),均购自河北新祁有限公司;葛根(批号为 18031901)、清半夏(批号为 18070701)、珍珠母(批号为 18011501)、干姜(批号为 18011601),均购自国药乐仁堂有限公司;桂枝(批号为 180601CP252)、茯苓(批号为 180601CP212)、牡蛎(批号为 180501CP154)、大枣(批号为 171201CP611),均购自河北万修药业有限公司。

2 方法与结果

2.1 试验条件

气相色谱条件:色谱柱为 DB-5ms 毛细管柱(30 m × 0.25 mm, 0.25 μm);载气为高纯度氦(纯度 ≥ 99.999%);流速为 1.0 mL/min;进样口温度为 250 °C;进样量为 1 μL;程序升温,起始温度 60 °C、保持 4 min,以 5 °C/min 的速率升至 170 °C、保持 4 min,以 5.0 °C/min 的速率升至 280 °C,保持 10 min;分流比为 20:1(分流进样)。

质谱条件:电离方式为电子轰击离子源,轰击能量为 70 eV;离子源温度为 230 °C;传输线温度为 250 °C;溶剂延迟时间为 4 min;质荷比(m/z)为 55~550。

2.2 供试品溶液制备

取样品内容物约 5 g,精密称定,加入 50 mL 正己烷,超声(功率 200 W,频率 40 kHz)处理 20 min(2 次),滤过,合并滤液,浓缩后用正己烷定容至 10 mL,上清液 4 000 r/min 离心 10 min,滤过,取续滤液,即得。

2.3 方法学考察

精密度试验:取供试品溶液(批号为 170813)适量,按 2.2 项下方法制备供试品溶液,按 2.1 项下试验条件进样测定 6 次,以 12 号峰为参照峰,计算各特征峰的相对保留时间及相对峰面积。结果各特征峰的相对保留时间的 RSD 小于 0.96%,相对峰面积的 RSD 小于 2.26% ($n=6$),表明仪器精密度良好。

稳定性试验:取供试品溶液(批号为 170813)适量,

按 2.2 项下方法制备供试品溶液,分别于室温下放置 0, 2, 4, 6, 8, 12, 16, 24 h 时按 2.1 项下试验条件进样测定,以 12 号峰为参照峰,计算各特征峰的相对保留时间及相对峰面积。结果各特征峰的相对保留时间的 RSD 小于 0.87% ($n=8$),相对峰面积的 RSD 小于 2.26% ($n=8$),表明室温下供试品溶液在 24 h 内基本稳定。

重复性试验:精密称取药材样品(批号为 170813)适量,各 6 份,按 2.2 项下方法制备供试品溶液,再按 2.1 项下试验条件进样测定,以 12 号峰为参照峰,计算各特征峰的相对保留时间及相对峰面积。结果各特征峰相对保留时间的 RSD 小于 0.91% ($n=6$),相对峰面积的 RSD 小于 2.91% ($n=6$),表明方法重复性良好。

2.4 GC-MS 指纹图谱的建立及共有峰的指认

指纹图谱建立:取 12 批样品,按 2.2 项下方法制备供试品溶液,按 2.1 项下试验条件进样测定,以其中峰面积最大的 12 号峰为参照峰,确定 53 个共有峰,将结果导入中药色谱指纹图谱超信息特征数字化评价系统 3.0 软件^[7],以平均值法计算生成对照指纹图谱,详见图 1。对 12 批样品及对照指纹图谱的 GC-MS 图进行拟合,得到 GC-MS 叠加指纹图谱,详见图 2。

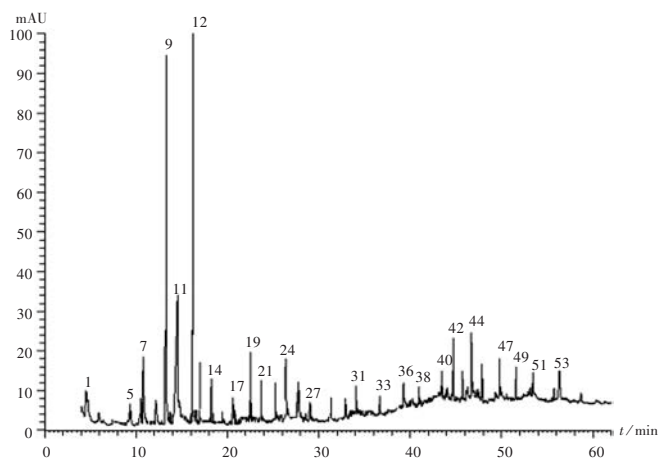


图 1 柴胡安心胶囊气相色谱串联质谱对照指纹图谱

Fig. 1 GC-MS reference fingerprint of Chaihu Anxin Capsules

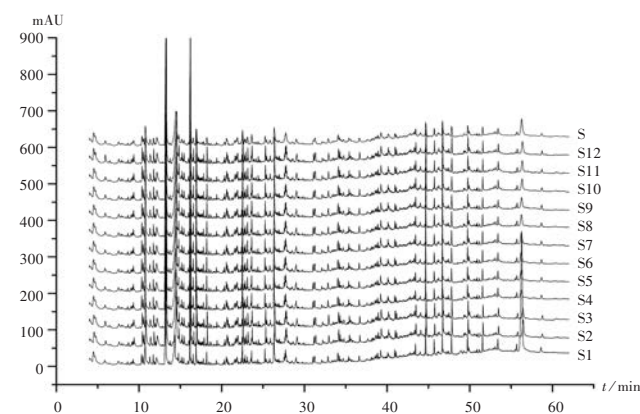


图 2 12 批柴胡安心胶囊气相色谱串联质谱叠加指纹图谱

Fig. 2 GC-MS superimposed fingerprint of 12 batches of Chaihu Anxin Capsules

整体评价柴胡安心胶囊质量:采用系统指纹定量法^[8],从中药的整体宏观定性角度和整体定量角度对其进行量化控制。宏定性相似度(S_m)为双定性相似度(S_F 和 S_F')均值,计算公式见式(1);宏定量相似度(P_m)为双定量相似度(C 和 P)均值,计算公式见式(2); α 为指纹均化性变动误差控制系数,计算公式见式(3),据此将中药质量划分为8级,详见表1^[9]。质量级别由 S_m 、 P_m 、 α 中最低参数决定,3个公式中, n 为指纹峰数, x_i 与 y_i 为各指纹峰的积分面积, γ 为指纹信号均化系数。

$$S_m = \frac{1}{2} \times (S_F + S_F') \times \frac{1}{2} \left(\frac{\sum_{i=1}^n x_i y_i}{\sqrt{\sum_{i=1}^n x_i^2} \sqrt{\sum_{i=1}^n y_i^2}} + \frac{\sum_{i=1}^n \frac{x_i}{y_i}}{\sqrt{n \sum_{i=1}^n \left(\frac{x_i}{y_i}\right)^2}} \right) \quad (1)$$

$$P_m = \frac{1}{2} (C + P) \frac{m_{RFP}}{m_i} = \frac{1}{2} \times \left(\frac{\sum_{i=1}^n x_i y_i}{\sum_{i=1}^n y_i^2} + \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{\sum_{i=1}^n y_i} S_F \right) \frac{m_{RFP}}{m_i} \times 100\% \quad (2)$$

$$\alpha = \left| 1 - \frac{\gamma_x}{\gamma_y} \right| \quad (3)$$

表1 系统指纹定量法判定依据

Tab. 1 The evaluation basis of system fingerprint quantitative method

参数	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
$S_m \geq$	0.95	0.90	0.85	0.80	0.70	0.60	0.50	<0.50
$P_m(\%)$	95~105	90~110	80~120	75~125	70~130	60~140	50~150	0~∞
$\alpha \leq$	0.05	0.10	0.15	0.20	0.30	0.40	0.50	>0.50
质量	极好	很好	好	良好	中	一般	次	劣

将GC-MS指纹图谱看作一个系统,用 S_m 表示指纹的数量和分布比例;用 P_m 监测指纹的整体含量;用 α 限定指纹变异范围。以对照指纹图谱为标准得12批样品的 S_m 、 P_m 、 α 值(见表2)。结果显示,除S1和S2外,其余10批柴胡安心胶囊的 S_m 均大于0.90,表明各个批次制剂中成分数量和分布比例十分相似,除S2外,其余批次样品的 P_m 均大于90,且不同批次样品含量有差异。根据系统指纹定量法可知,样品质量极好、很好、中等的分别有5批、5批、2批。

共有峰归属和指认:对12批样品的GC-MS指纹

图谱根据共有峰的保留时间,结合美国国家标准与技术局(NIST)谱库检索及文献检索^[10-15],并进行对比,共标定53个共有峰,其中44个峰占峰面积的99.57%,故对这44个峰进行鉴定。鉴定出了44种化学成分并确定了归属,其中主要包括糠醛(22.50%)、丹皮酚(15.80%)、棕榈酸(12.33%)、桉叶油醇(4.48%)等,详见表3。结果表明,挥发性成分多数出自柴胡、葛根、白芍、延胡索、夏枯草、半夏、桂枝药材(占峰面积的97.15%),上述药材在组方中的配比超过65%,进一步证实了挥发性成分可能在柴胡安心胶囊的药效物质基础中发挥了积极作用。

3 讨论

本试验中采用GC-MS法对柴胡安心胶囊挥发性成分进行指纹图谱研究,为了更好地反映其挥发性成分,供试品溶液制备过程中,比较了回流法、超声法、挥发油法的提取率。结果表明,后两者优于前者,从图谱结果观察后两者结果差异不大,以操作简便考量,选择超声法作为提取方法。并考察了石油醚、正己烷、乙酸乙酯、二氯甲烷、乙腈等溶剂对提取结果的影响,结果表明,以正己烷为溶剂时提取最完全,色谱图的峰数最多,干扰成分最少,基线最平,故以正己烷作为提取溶剂。

本试验采用“中药色谱指纹图谱超信息特征数字化评价系统3.0”软件,以平均值法计算生成对照指纹图谱,对12批样品及对照指纹图谱的GC-MS图进行拟合,得GC-MS叠加指纹图谱,按系统指纹定量法鉴别出12批样品的不同质量等级。该法与国家药典委员会“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004A版)”相比,前者以夹角余弦法与相关系数法计算相似度受大指纹峰影响严重,不仅掩盖了小峰贡献,且不能定量评价,对于小峰突出且有可能为活性成分的指纹图谱鉴定质量可能导致误判。本研究中采用的系统指纹定量法,将中药的指纹整体看作一个系统,应用 S_m 、 P_m 、 α 对中药指纹量和分布比例、含量、比例变异范围进行了整体监测,三者结合来控制中药质量,克服了传统的中药指纹图谱技术的小峰模糊化的缺点。

GC-MS法可用于鉴别药物的真伪和判断中药材及制剂质量的稳定性^[16]。相较于液相色谱串联质谱法,GC-MS法重复性好,化合物裂解图谱再现性高,具有商品化的谱库可供检索,在缺乏对照品的情况下依然是化

表2 12批柴胡安心胶囊质量判定结果

Tab. 2 Quality evaluation results of 12 batches of Chaihu Anxin Capsules

参数	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12
S_m	0.87	0.86	0.92	0.95	0.95	0.96	0.97	0.97	0.97	0.96	0.95	0.94
$P_m(\%)$	95.36	89.25	94.41	96.18	95.48	98.50	99.52	99.66	98.93	98.46	99.17	98.99
α	0.14	0.05	0.04	0.05	0.05	0.06	0.05	0.05	0.06	0.06	0.06	0.06
级别	III	III	II	I	I	I	I	I	II	II	II	II
质量	中等	中等	很好	极好	极好	极好	极好	极好	很好	很好	很好	很好

表3 柴胡安心胶囊 GC-MS 指纹图谱中 44 个共有峰指认结果

Tab. 3 Identification of 44 common peaks in GC-MS fingerprint of Chaihu Anxin Capsules

编号	保留时间(min)	化学成分	分子式	百分含量(%)	归属	编号	保留时间(min)	化学成分	分子式	百分含量(%)	归属
1	4.55	正己醛	C ₆ H ₁₂ O	1.39	柴胡	23	22.54	亚油酸	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	2.11	白芍、夏枯草
2	5.93	己烷基丁醇	C ₆ H ₁₂ O	0.59	甘草	24	23.13	雪松醇	C ₁₅ H ₂₆ O	0.80	白芍
3	7.58	顺式桃金娘烯醇	C ₁₀ H ₁₆ O	0.83	白芍	25	25.28	百里香酚	C ₁₀ H ₁₄ O	1.22	柴胡
4	7.89	2-丁烯苯	C ₁₀ H ₁₂	0.17	桂枝	26	26.37	豆蔻酸	C ₁₄ H ₂₈ O ₂	0.98	白芍
5	9.06	庚酮	C ₇ H ₁₄ O	0.25	甘草	27	27.78	β-没药烯	C ₁₅ H ₂₄	3.45	延胡索
6	9.23	2-甲基-1-苯丙烯	C ₁₀ H ₁₂	0.29	桂枝	28	29.06	α-榄香烯	C ₁₅ H ₂₄	0.49	生姜
7	9.35	樟脑	C ₁₀ H ₁₆ O	0.60	生姜	29	31.31	α-长叶蒎烯	C ₁₅ H ₂₄	0.95	延胡索
8	10.37	丹皮酚	C ₉ H ₁₀ O ₃	15.8	白芍、延胡索	30	34.10	斯巴醇	C ₁₅ H ₂₄ O	1.36	柴胡、夏枯草
9	10.54	α-蒎烯	C ₁₀ H ₁₆	0.96	葛根	31	35.42	9,12-十八碳二烯酸甲酯	C ₁₉ H ₃₄ O ₂	0.69	白芍
10	10.78	桉叶油醇	C ₁₀ H ₁₈ O	4.48	柴胡	32	36.68	香橙烯	C ₁₅ H ₂₄	0.61	夏枯草
11	11.79	α-松油醇	C ₁₀ H ₁₈ O	1.14	生姜、桂枝	33	39.27	二十二醇	C ₂₂ H ₄₆ O	0.68	半夏
12	13.29	糠醛	C ₅ H ₄ O ₂	22.5	柴胡、夏枯草	34	40.13	4-乙烯基-2-甲氧基苯酚	C ₉ H ₁₀ O ₂	1.40	夏枯草
13	14.56	(+)-4-萜烯	C ₁₀ H ₁₆	1.37	葛根	35	43.46	植烷	C ₂₀ H ₄₂	0.65	半夏
14	16.22	棕榈酸	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	12.33	半夏、柴胡	36	44.70	二十酸	C ₂₀ H ₄₀ O ₂	1.23	甘草、葛根
15	16.95	肉桂醛	C ₉ H ₈ O	3.29	桂枝	37	46.71	6,10,14-三甲基-2-十五烷酮	C ₁₈ H ₃₆ O	2.00	夏枯草
16	18.23	α-柏木烯	C ₁₅ H ₂₄	1.28	桂枝	38	47.84	17-三十五烯	C ₃₅ H ₇₀	2.21	半夏
17	18.72	4,6-二甲基十二烷	C ₁₄ H ₃₀	0.36	葛根	39	51.58	叔十六硫醇	C ₁₆ H ₃₄ S	1.47	半夏
18	19.38	桃金娘烯醛	C ₁₀ H ₁₆ O	0.53	柴胡	40	53.44	二十二烷	C ₂₂ H ₄₆	1.18	葛根
19	20.36	姜黄烯	C ₁₅ H ₂₂	0.49	生姜	41	56.32	癸二酸二异辛酯	C ₂₆ H ₅₀ O ₄	1.02	半夏
20	20.61	薄荷醇	C ₁₀ H ₂₀ O	0.54	柴胡	42	59.67	2-呋喃甲醇	C ₅ H ₆ O ₂	3.15	夏枯草
21	21.62	2,6,10,14-四甲基十七烷	C ₂₁ H ₄₄	0.23	延胡索	43	60.38	β-谷甾醇	C ₂₉ H ₅₀ O	0.67	半夏
22	21.92	(-)-9-萜烯茄烯	C ₁₅ H ₂₄	1.56	桂枝	44	61.59	9,12-十八碳二烯酸乙酯	C ₂₀ H ₃₆ O ₂	0.27	葛根

物定性分析的有效方法^[17]。本试验中采用 NIST 谱库对小分子挥发性成分进行指认,其谱图结果稳定、可靠。

由药味归属及共有峰指认结果可知,柴胡安心胶囊的指纹图谱主要反映了柴胡、夏枯草、白芍、延胡索、桂枝这 5 种药味的成分,且大都为活性成分。如柴胡中的棕榈酸可增强免疫力、保护心血管,白芍中的丹皮酚可抗抑郁、抗焦虑,亚油酸可调血脂、软化血管,夏枯草中糠醛可抗炎、调节免疫,桂枝中肉桂醛可镇静、降压等。通过在指纹图谱中控制上述成分,可有效评价该制剂的整体质量。

综上所述,所建立的 GC-MS 指纹图谱法简单、稳定、可靠,可用于柴胡安心胶囊挥发性成分的研究及整体质量控制,也为后续药效学的研究提供了参考。

参考文献

- [1] 胡倩,金司仪,李丹清,等. 柴胡挥发油的研究进展[J]. 中南药学, 2019,17(9):1499-1503.
- [2] 赵朕雄,冯茹,符洁,等. GC-MS 联用法分析不同产地白芍和赤芍挥发油成分[J]. 药物分析杂志, 2019,35(4):627-634.
- [3] 张利青,张占刚,付岩,等. 桂皮醛药理作用的研究进展[J]. 中国中药杂志, 2015,23(4):4568-4572.
- [4] 于静,焦丽亚,张振杰,等. 柴胡安心胶囊平行四波长高效液相色谱指纹图谱研究[J]. 中国药业, 2019,28(21):17-20.

- [5] 王淑红,杨继章,张振杰,等. 柴胡安心胶囊的薄层色谱鉴别[J]. 中国药业, 2010,19(3):29.
- [6] 孙国祥,孙万阳,张晶,等. 中药质量一致性评价体系-基于定量指纹图谱检查的中药标准制剂控制模式的解析[J]. 中南药学, 2018,16(1):1-13.
- [7] YANG LANPING, SUN GUOXIANG, GUO YONG, et al. Holistic Evaluation of Quality Consistency of *Ixeris sonchifolia* (Bunge) Hance Injectables by Quantitative Fingerprinting in Combination with Antioxidant Activity and Chemometric Methods[J]. PLoS One, 2016,11(2):1-15.
- [8] ZHANG YJ, YANG FL, ZHANG J, et al. Quantitative fingerprint and quality control analysis of Compound Liquorice Tablet combined with antioxidant activities and chemometrics methods[J]. Phytomedicine, 2019,59:152790.
- [9] CHEN S, SUN GX, YANG LP, et al. Micellar electrokinetic chromatography fingerprinting combined with chemometrics as an efficient strategy for evaluating the quality consistency and predicting the antioxidant activity of Lianqiao Baidu pills[J]. Journal of Separation Science, 2017,40(13):2838-2848.
- [10] 陈文露,彭新宇,余静贤,等. 不同制备工艺柴胡注射液成分分析及质量标准探讨[J]. 中成药, 2019,41(4):895-901.
- [11] 叶耀辉,张博文,郑红梅,等. 顶空进样 GC-MS 分析柴胡不同炮制品的挥发性成分[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017,23(18):11-14.
- [12] 周倩,王亮,戴衍朋,等. 基于 GC-MS 分析蜜灸对甘