

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2022.07.015

金卷升板胶囊挥发性成分气相色谱-质谱联用指纹图谱研究*

李雅廉¹, 于 静², 郭智敏², 王玲娇^{2△}, 李雅洁¹, 杨继章², 孙国祥³

(1. 北京市朝阳区六里屯社区卫生服务中心, 北京 100026; 2. 河北医科大学第一医院药学部, 河北 石家庄 050031; 3. 沈阳药科大学药学院, 辽宁 沈阳 110016)

摘要:目的 建立金卷升板胶囊中挥发性成分的气相色谱-质谱(GC-MS)指纹图谱。方法 色谱柱为 DB-5 毛细管柱(30 m × 0.32 mm, 0.25 μm), 载气为高纯度氦(纯度 ≥ 99.999%), 流速为 1.0 mL/min, 程序升温, 进样量为 0.5 μL; 电离方式为电子轰击离子源, 检测器温度为 300 ℃, 溶剂延迟时间为 4 min, 质荷比(m/z)为 55~550。测定 12 批样品的指纹图谱, 通过中药色谱指纹图谱超信息特征数字化评价系统 3.0 软件建立共有峰, 并评价相似度, 运用美国国家标准与技术研究院(NIST)标准质谱数据库并参考文献对共有峰进行分析。结果 12 批样品的 GC-MS 图谱共确定了 52 个共有峰, 鉴定出 46 种成分; 除第 1 批与第 12 批外, 其余批次样品的相似度为 90%~110%。结论 建立的 GC-MS 指纹图谱法操作简便, 稳定性良好, 可用于检测金卷升板胶囊中的挥发性成分, 并全面控制其质量。

关键词:金卷升板胶囊; 气相色谱-质谱法; 指纹图谱; 挥发性成分; 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(2022)07-0064-04

Fingerprint of Volatile Ingredients in Jinjuan Shengban Capsules by Gas Chromatography - Mass Spectrometry

LI Yalian¹, YU Jing², GUO Zhimin², WANG Lingjiao², LI Yajie¹, YANG Jizhang², SUN Guoxiang³

(1. Liulitun Community Health Service Center, Chaoyang District of Beijing, Beijing, China 100026; 2. Department of Pharmacy, The First Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang, Hebei, China 050031; 3. Department of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang, Liaoning, China 110016)

Abstract: Objective To establish a gas chromatography - mass spectrometry (GC - MS) fingerprint of volatile ingredients in Jinjuan Shengban Capsules. **Methods** The chromatographic column was DB - 5 capillary column (30 m × 0.32 mm, 0.25 μm), the carrier gas was high - purity helium (purity ≥ 99.999%), and the flow rate was 1.0 mL/min, the temperature was programmed, and the injection volume was 0.5 μL. The ionization mode was adopted with electron - bombardment ion source, the temperature of the detector was 300 ℃, the delay time of solvent was 4 min, and the mass - to - charge ratio(m/z) was 55 - 550. The GC - MS fingerprints of 12 batches of samples were determined through the software of Digitized Evaluation System for Super - information Characteristics of the Traditional Chinese Medicine (TCM) Chromatographic Fingerprints 3.0 to establish common peaks and evaluate the similarity. The common peaks were analyzed by the standard mass spectrometry databases of National Institute of Standards and Technology (NIST) and references. **Results** A total of 52 common peaks were identified in the GC - MS fingerprints of 12 batches of samples, and 46 ingredients were identified. Except for the first batch and the 12th batch, the similarity of other batches of samples was 90% - 110%. **Conclusion** The GC - MS fingerprint method established is simple and stable, which can be used for the determination of the volatile ingredients in Jinjuan Shengban Capsules and controlling its quality.

Key words: Jinjuan Shengban Capsules; GC - MS; fingerprint; volatile ingredient; quality control

金卷升板方为河北医科大学第一医院多年临床实践的协定处方, 拟开发为院内胶囊制剂, 主治原发性免疫性血小板减少症。其由金银花、白术、茜草、熟大黄等中药材组方, 富含挥发性成分, 具有解毒散瘀、清热凉血、止血通络之功效。方中, 金银花所含 β -谷甾醇可凉血止血^[1], 白术所含苍术酮能增强免疫力^[2], 茜草所含反式角鲨烯用于活血通络^[3], 熟大黄所含呋喃

醛具有解毒、抗炎作用^[4]。方中药材含有的挥发性成分超过 50%, 但目前的研究集中于极性成分^[5-6], 尚未见关于其挥发性成分质量评价的报道。中药指纹图谱技术收载于《中国药典》, 近年来基于多方位数据处理的数字化指纹图谱技术已逐渐被业内广泛接受, 能评价中药质量的真实性、优良性和稳定性。本研究中建立了测定金卷升板胶囊中挥发性成分的气相色谱-质

*基金项目: 河北中医药管理局中医药类科研项目[2021128]。

第一作者: 李雅廉, 女, 大学本科, 主治医师, 研究方向为中药质量控制, (电话)010-85988069(电子信箱)327239256@qq.com。

△通信作者: 王玲娇, 女, 硕士, 副主任药师, 研究方向为中药质量控制, (电话)0311-87156670。

谱(GC-MS)指纹图谱,并对指纹图谱中的共有峰进行化学指认,为其质量标准改进和后续的药效学研究提供参考。现报道如下。

1 仪器与试药

1.1 仪器

TRACE DSQ型GC-MS仪(美国热电公司);Sartorius BS 110S型分析天平(赛多利斯科学仪器<北京>有限公司,精度为万分之一);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,功率为400 W,频率为40 kHz)。

1.2 试药

金卷升板胶囊(河北医科大学第一医院院内制剂,批号分别为150601,150518,150419,150407,080115,080302,080403,080505,080506,080709,180725,180923,规格为每粒0.5 g);金银花(批号为180801CP193),白术(批号为180201CP270),地锦草(批号为180701CP383),卷柏(批号为180101CP404),茜草(批号为180601CP608),山药(批号为180802CP016),水牛角(批号为180101CP493),均购自河北万修药业有限公司;黄芩(批号为20170302),熟地黄(批号为20170502),均购自河北新祁中药颗粒饮片有限公司;紫草(国药乐仁堂河北药业有限公司,批号为17041501)。上述药材均经河北医科大学第一医院张振杰主管中药师鉴定为正品,均符合2020年版《中国药典(一部)》的药用标准。

2 方法与结果

2.1 气相色谱(GC)与质谱(MS)条件

GC条件:色谱柱为DB-5毛细管柱(30 m×0.32 mm,0.25 μm);载气为高纯度氮(纯度≥99.999%);流速为1.0 mL/min;进样口温度为250℃;进样量为0.5 μL;程序升温(起始温度为60℃,以10℃/min的速率升至150℃,以2℃/min的速率升至210℃,保持10 min;以10℃/min的速率升至280℃,保持9 min);分流进样,分流比为5:1。

MS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℃;传输线温度为250℃;检测器温度为300℃;溶剂延迟时间为4 min;质荷比为(m/z)为55~550。

2.2 供试品溶液制备

取样品,研磨,取粉末6 g,精密称定,加入15 mL石油醚,超声(功率为250 W,频率为40 kHz)20 min,离心5 min,取上清液,加入15 mL石油醚,超声20 min,离心5 min,取上清液,浓缩至1 mL,过滤,取滤液,即得。

2.3 方法学考察

精密度试验:取样品内容物(批号为150518)适

量,按2.2项下方法制备供试品溶液,按2.1项下试验条件连续进样测定6次,记录各指纹峰相对保留时间和峰面积。结果各指纹峰相对保留时间的 $RSD < 2.08\%$ ($n=6$),相对峰面积的 $RSD < 2.84\%$ ($n=6$),表明仪器精密度良好。

稳定性试验:取样品内容物(批号为150518)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项下试验条件连续进样测定6次,记录各指纹峰相对保留时间和峰面积。结果各指纹峰相对保留时间的 $RSD < 2.94\%$ ($n=8$),相对峰面积的 $RSD < 3.07\%$ ($n=8$),表明供试品溶液在室温下放置24 h内稳定性良好。

重复性试验:取样品内容物(批号为150518)适量,共6份,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,记录各指纹峰相对保留时间和相对峰面积。结果各指纹峰相对保留时间的 $RSD < 1.91\%$ ($n=6$),相对峰面积的 $RSD < 3.41\%$ ($n=6$),表明方法重复性良好。

2.4 GC-MS 指纹图谱建立及共有峰指认

2.4.1 特征图谱建立和相似度评价

取12批样品适量,按2.2项下方法制备供试品溶液,按2.1项下试验条件分别进样测定,记录色谱图。其中22号峰在各批样品的指纹图谱中分离度均良好,响应值较高,峰面积较大,为12批样品共有,故定义为参照峰。按出峰率100%计算,共确定52个共有指纹峰。将谱图积分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],经校正,以平均值法生成对照指纹图谱(图1)。对12批样品及对照指纹图谱进行拟合,得到GC-MS叠加指纹图谱(图2)。

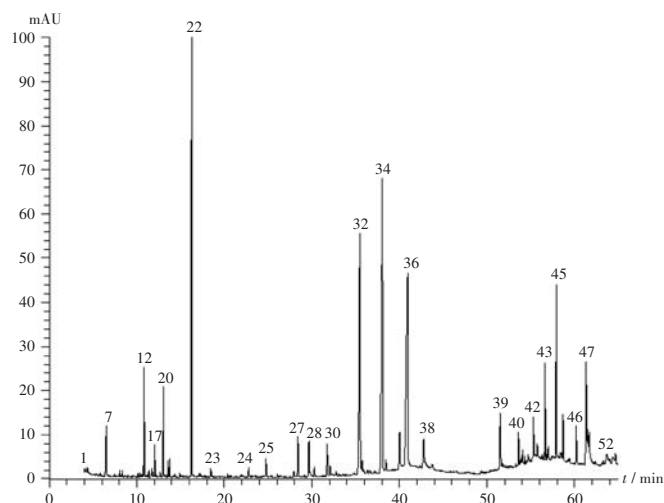


图1 金卷升板胶囊气相色谱-质谱对照指纹图谱

Fig. 1 GC-MS reference fingerprints of Jinjuan Shengban Capsules

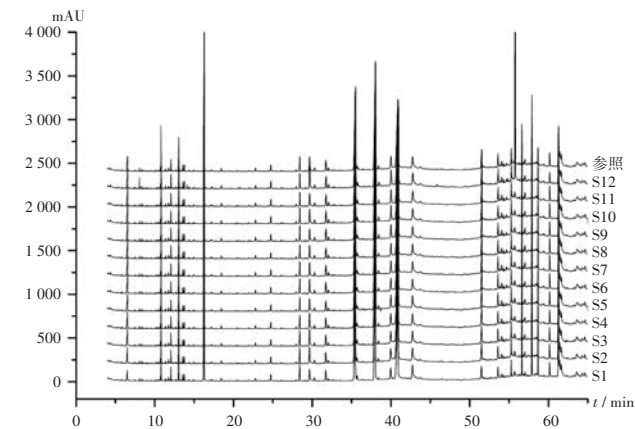


图2 12批金卷升板胶囊气相色谱-质谱叠加指纹图谱
Fig.2 GC-MS superimposed fingerprints of 12 batches of Jinjuan Shengban Capsules

表1 12批金卷升板胶囊质量评价结果

Tab.1 Quality evaluation results of 12 batches of Jinjuan Shengban Capsules

参数	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12
S_m	0.94	0.96	0.98	0.92	0.99	0.96	0.93	0.92	0.98	0.91	0.97	0.78
$P_m(\%)$	85.79	94.91	93.24	90.79	98.61	98.92	106.01	99.72	103.03	110.92	100.04	104.12
α	0.11	0.04	0.02	0.06	0.02	0.01	0.04	0.05	0.01	0.02	0.05	0.19
等级/质量	3/好	2/很好	2/很好	2/很好	1/极好	1/极好	2/很好	2/很好	1/极好	3/好	1/极好	5/中等

间,自动检索美国国家标准与技术研究院(NIST)标准质谱数据库,并与文献[10-13]对比,对谱图中的52个共有峰进行鉴定,最终对其中的46个峰进行了指认,并进行分析和药味归属,发现其化学成分主要包括 γ -榄香烯(10.91%)、反式角鲨烯(13.93%)、柏木醇(18.62%)、叶绿醇(13.55%)等,详见表2。可见,制剂中的挥发性组分多源于金银花、白术、茜草、大黄、地锦草、黄芩、紫草、卷柏等药材(占制剂药材配比的80%),证实了对挥发性成分的研究可对金卷升板胶囊的整体质量控制提供参考。

3 讨论

本研究中为了使指纹图谱的样品信息最大化,更好地反映其挥发性成分,在供试品溶液制备过程中,考察了石油醚、乙酸乙酯、二氯甲烷、二甲基亚砜等溶剂对提取结果的影响,结果以石油醚为溶剂时得到色谱图的色谱峰最多,干扰成分最少,故选择石油醚作为提取溶剂。考察了不同极性的气相色谱柱(安捷伦HP-5, DB-5, DB-17毛细管色谱柱),通过优化程序升温条件,比较各谱图的色谱峰数量及分离度,结果采用DB-5色谱柱所得色谱图的色谱峰数量最多,响应值最高,各组分间的分离度最好,故选择DB-5色谱柱进行分析。

中药指纹图谱技术作为一种简便、稳定、可靠的中药质控方法,在药效成分或活性成分未明确前运用指纹图谱技术进行中成药的质量评价,较传统的单一成

从样品的指纹图谱整体出发,用 S_m 表示样品中化学指纹的数量和分布比例,用 P_m 表示样品图谱的整体含量,用 α 表示样品的指纹变异范围^[8-9]。以金卷升板胶囊的参照峰为标准,分别计算12批样品的 S_m 、 P_m 、 α (表1)。结果除S12外,其余11批样品的 $S_m \geq 0.90$,表明各批样品中成分数量和分布比例相似;各批样品的 P_m 差异较大,S1的 $P_m < 90\%$,S10的 $P_m > 110\%$,其余批次样品的 P_m 为90%~110%,表明各批样品的含量有差异,而差异过大或过小均会影响药品质量;参考系统指纹定量法评价等级结果,S5、S6、S9、S11的质量极好,S2、S3、S4、S7、S8的质量很好,S1和S10的质量好,S12的质量中等。

2.4.2 共有峰指认及药味归属分析

根据12批样品GC-MS指纹图谱共有峰的保留时

分或指标性成分评价更具整体性和全面性^[14-15]。本研究中采用中药色谱指纹图谱超信息特征数字化评价系统3.0软件进行共有峰指认,采用系统指纹定量法进行评价,不仅可代替国家药典委员会的中药指纹软件定性评价中药质量(国家药典委软件不能解析质谱数据),且将各批样品指纹中的大峰和小峰进行多维度统一化管理,使生成的对照指纹图谱稳定、可靠,进而定量反映金卷升板胶囊的指纹数量、所占比例和确切含量,弥补了国家药典委员会软件受指纹大峰影响严重、对指纹小峰突出、有可能为活性成分而不能准确判断的缺点,从而精准、有效地评价质量。

根据药味归属及共有峰指认结果,发现金卷升板胶囊的GC-MS指纹图谱能反映样品中金银花、白术、茜草、熟地黄、紫草、黄芩等药材的成分,且多数具有生物学活性。通过GC-MS指纹图谱技术控制上述化学成分所占比例,不仅可有效评价金卷升板胶囊的质量,也为后续其挥发性成分的提取提供了数据支持。

综上所述,本研究中建立的金卷升板胶囊的GC-MS指纹图谱法操作简便、可行,稳定性良好,可用于检测该制剂的挥发性成分,全面控制其质量,也为后续基于多组分的药理学机制研究提供了依据。

参考文献

[1] 王亚琼,陈卫,钟水生,等.金银花清热解毒作用的血清代谢组学研究[J].中药材,2016,39(5):1129-1133.
[2] 李然,李静,童巧珍,等.道地药材平江白术挥发油的

表 2 12 批金卷升板胶囊指纹图谱共有峰鉴定结果

Tab. 2 Identification results of the common peaks of 12 batches of Jinjuan Shengban Capsules

序号	保留时间(min)	化合物名称	分子式	含量(%)	归属	序号	保留时间(min)	化合物名称	分子式	含量(%)	归属
1	4.36	α -愈创木烯(α -guaiene)	C ₁₅ H ₂₄	0.26	大黄	24	20.39	樟脑(camphor)	C ₁₀ H ₁₆ O	0.11	紫草
2	4.50	环己烷(cyclohexane)	C ₆ H ₁₂	0.11	金银花	25	20.83	肉桂醛(cinnamaldehyde)	C ₉ H ₈ O	0.04	紫草
3	5.11	苯乙酮(acetophenone)	C ₈ H ₈ O	0.24	黄芩	26	21.94	α -紫罗兰酮(α -ionone)	C ₁₃ H ₂₀ O	0.13	地锦草
4	5.45	己基环乙烷(hexyl-cyclohexano)	C ₈ H ₁₆	0.13	卷柏	27	22.79	可巴烯(copaene)	C ₁₅ H ₂₄	0.48	地锦草
5	5.79	正己醛(hexanal)	C ₆ H ₁₂ O	0.11	金银花	28	24.75	芷香酮(ionone)	C ₁₃ H ₂₀ O	0.85	茜草
6	5.93	糠醛(furfural)	C ₅ H ₄ O ₂	0.03	大黄	29	28.41	肉豆蔻醛(myristic aldehyde)	C ₁₄ H ₂₆ O	1.96	紫草
7	6.56	1,1-二甲基乙烯基环己烷 (1,1-dimethyl-vinylcyclohexane)	C ₈ H ₁₆ O	2.04	茜草	30	29.66	石竹烯(caryophyllene)	C ₁₅ H ₂₄	0.26	黄芩
8	7.49	正癸烷(decane)	C ₁₀ H ₂₂	0.12	卷柏	31	31.74	β -榄香烯(β -elemene)	C ₁₅ H ₂₄	1.68	白术
9	8.06	棕榈酸甲酯(methyl hexadecanoate)	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	0.12	金银花	32	32.06	香茅醛(citronellal)	C ₁₅ H ₂₄	0.56	紫草
10	8.36	1,2-二甲基苯(1,2-dimethylbenzene)	C ₈ H ₁₀	0.42	茜草	33	35.50	反式角鲨烯[(E,E,E,E)-squalene]	C ₃₀ H ₅₀	13.93	茜草
11	8.99	γ -榄香烯(γ -elemene)	C ₁₅ H ₂₄	10.91	白术	34	37.98	亚麻酸甲酯(9,12,15-octadecatrienoic acid, methyl ester)	C ₁₉ H ₃₂ O ₂	2.42	金银花
12	10.19	肉桂酸甲酯(methyl cinnamate)	C ₁₀ H ₁₀ O ₂	0.13	黄芩	35	38.06	柏木醇(cedrol)	C ₁₅ H ₂₆ O	18.62	金银花
13	10.46	吡喃酮(pyron)	C ₆ H ₄ O ₂	0.08	地锦草	36	40.86	β -桉油醇(β -eudesmol)	C ₁₅ H ₂₆ O	2.22	白术
14	10.73	顺-7-十四烯乙酸酯 [(Z)-7-tetradecenyl acetate]	C ₁₆ H ₃₀ O ₂	0.27	金银花	37	40.95	叶绿醇(phytol)	C ₃₀ H ₆₀ O	13.55	茜草
15	10.80	苯甲醛(benzaldehyde)	C ₇ H ₆ O	1.57	大黄	38	42.76	肉桂酸乙酯(ethyl cinnamate)	C ₁₁ H ₁₂ O	2.88	大黄
16	11.38	5-甲基呋喃醛(5-methyl furfural)	C ₆ H ₆ O ₂	0.14	大黄	39	45.67	黄芩素(haicaicin)	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	2.70	黄芩
17	11.75	乙酸(acetic acid)	C ₂ H ₄ O ₂	0.34	大黄	40	49.39	棕榈酸乙酯(ethyl palmitate)	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	0.12	大黄
18	12.04	β -谷甾醇(β -sitosterol)	C ₂₈ H ₄₈ O	0.85	金银花	41	51.53	二十一烷(heneicosane)	C ₂₁ H ₄₄	3.42	金银花
19	13.05	棕榈酸(palmitic acid)	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	1.32	地锦草、黄芩	42	53.59	香叶烯(myrcene)	C ₁₅ H ₂₄	1.46	黄芩
20	13.58	邻苯二甲酸二丁酯(dibutyl phthalate)	C ₁₆ H ₂₂ O ₄	0.53	地锦草	43	55.74	苍术酮(atractylon)	C ₁₅ H ₂₀ O	0.75	白术
21	16.27	棕榈酸乙酯(ethyl palmitate)	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	2.49	茜草	44	57.92	白术内酯Ⅱ(atractylenolide Ⅱ)	C ₁₅ H ₂₀ O	1.93	白术
22	17.17	亚油酸乙酯(ethyl linoleate)	C ₂₀ H ₃₈ O ₂	2.11	金银花、茜草	45	58.69	黄芩苷(haicalin)	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₁	0.69	黄芩
23	17.26	硬脂酸甲酯(methyl stearate)	C ₁₉ H ₃₈ O ₂	0.09	黄芩	46	60.17	白术内酯Ⅰ(atractylenolide Ⅰ)	C ₁₅ H ₂₀ O ₂	0.55	白术

GC-MS 指纹图谱研究[J]. 广东药科大学学报,2019,35(5): 624-628.

[3] 陈 毅,王海丽,薛 露,等. 茜草的研究进展[J]. 中草药, 2017,48(13):2771-2779.

[4] 王 云,张 雪,麻印莲,等. 熟大黄的炮制、药效及临床应用研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2018,24(24):219-226.

[5] 王玲娇,王 素,郑旭光,等. HPLC 法同时测定金卷升板胶囊中 5 种成分的含量[J]. 中国临床药理学杂志,2019,35(13): 1374-1377.

[6] 王玲娇,高 先,刘清池,等. 多指标综合评分结合响应面法优选金卷升板胶囊的超声提取工艺[J]. 中国药房,2019, 30(13):1781-1786.

[7] YANG LP,SUN GX,GUO Y,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] 于 静,陈 威,张彦景,等. 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[J]. 中国药业,2021,30(10):61-65.

[9] 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.

[10] 崔 锦,陈杰桃,穆 青. 抗菌中草药紫草的 GC-MS 分析[J]. 复旦学报(自然科学版),2015,54(4):511-515.

[11] 黎维维,雷 杰,马先奎,等. HS-SPME-GC-MS 技术分析三种卷柏属植物的挥发性成分[J]. 遵义医科大学学报, 2020,43(4):462-469.

[12] 黄 琪,吴德玲,王 云,等. 黄芩炒炭前后挥发性成分的 GC-MS 分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2016,22(24):9-12.

[13] 王玲娜,邹廷伟,陈燕文,等. “华金 6 号”金银花新品种挥发油成分的 GC-MS 分析[J]. 中药材,2016,39(7):1571-1573.

[14] 彭加兵,严安定,陈昆鹏,等. 不同方法提取颍半夏挥发油化学成分的气相色谱-质谱联用法分析[J]. 中国药业, 2019,28(9):25-27.

[15] 杨方良,张 晶,孙国祥,等. 中药组方指纹图谱研究方法和思路[J]. 色谱,2016,34(7):715-725.

(收稿日期:2021-06-29;修回日期:2021-10-09)