

GC-MS联用技术测定荆芥挥发油中6种单萜类化合物的含量^Δ

单鸣秋*, 于 生, 孙文君, 冯星星, 丁安伟(南京中医药大学江苏省方剂高技术研究重点实验室, 南京 210046)

中图分类号 R284.1;R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)15-1377-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.15.12

摘要 目的:建立测定荆芥挥发油中6种单萜类化合物(β -香叶烯、D-柠檬烯、薄荷酮、薄荷呋喃、胡薄荷酮、 β -石竹烯)含量的方法。方法:采用气相色谱-质谱联用技术。色谱柱为HP-5MS毛细管柱(30 m \times 0.25 mm \times 0.25 μ m),载气为氦气,载气流速为1.0 ml/min,进样口温度为220 $^{\circ}$ C,程序升温;离子源为电轰击电离源,电子能量为70 eV,离子源温度为230 $^{\circ}$ C,四级杆温度为150 $^{\circ}$ C,接口温度为280 $^{\circ}$ C,质量扫描范围为40~400 amu。结果: β -香叶烯、D-柠檬烯、薄荷酮、薄荷呋喃、胡薄荷酮和 β -石竹烯的质量浓度分别在0.003 18~0.031 80、0.042 26~0.422 60、0.351 68~3.516 80、0.019 34~0.193 40、0.611 20~6.112 00、0.007 98~0.079 80 mg/ml范围内与各自峰面积积分值呈良好的线性关系(r 分别为0.999 3、0.999 8、0.999 4、0.999 7、0.999 9、0.999 5);精密性、重复性、稳定性试验的RSD均 $<$ 3%;平均加样回收率分别为99.22%、98.34%、98.05%、97.56%、98.22%、99.06%,RSD分别为0.86%、0.92%、2.28%、1.21%、1.61%、1.17%(n 均为6)。结论:该方法专属性强、准确度高、重复性好,可用于荆芥挥发油的质量控制。

关键词 荆芥挥发油;单萜;气相色谱-质谱联用技术;含量测定

Content Determination of 6 Monoterpenoids in Volatile Oil of *Schizonepeta tenuifolia* by GC-MS

SHAN Ming-qiu, YU Sheng, SUN Wen-jun, FENG Xing-xing, DING An-wei(Key Laboratory for High Technology Research of TCM Formula, Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210046, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the method for the content determination of 6 monoterpenoids (β -myrcene, limonene, menthone, menthofuran, pulegone and β -caryophyllene) in volatile oil of *Schizonepeta tenuifolia*. METHODS: GC-MS method was adopted. A HP-5MS (30 m \times 0.25 mm \times 0.25 μ m) column was used with helium as carrier gas at flow rate of 1.0 ml/min. The injector temperature was 220 $^{\circ}$ C by temperature programming. Mass spectrometer conditions were: ionization mode: EI, electron energy 70 eV, ion source temperature: 230 $^{\circ}$ C; quadrupole temperature: 150 $^{\circ}$ C, interface temperature: 280 $^{\circ}$ C, mass scan range: 40-400 amu. RESULTS: The linear ranges of β -myrcene, limonene, menthone, menthofuran, pulegone and β -caryophyllene were 0.003 18-0.031 80 mg/ml($r=0.999 3$), 0.042 26-0.422 60 mg/ml($r=0.999 8$), 0.351 68-3.516 80 mg/ml($r=0.999 4$), 0.019 34-0.193 40 mg/ml($r=0.999 7$), 0.611 20-6.112 00 mg/ml($r=0.999 9$) and 0.007 98-0.079 80 mg/ml($r=0.999 5$), respectively. RSDs of precision test, reproducibility test and stability test were all lower than 3%. The average recovery rates were 99.22%, 98.34%, 98.05%, 97.56%, 98.22% and 99.06%, and RSDs were 0.86%, 0.92%, 2.28%, 1.21%, 1.61%, 1.17% ($n=6$). CONCLUSION: The established method has strong specificity, high accuracy and good reproducibility. It can be used for quality control of volatile oil of *S. tenuifolia*.

KEY WORDS Volatile oil of *Schizonepeta tenuifolia*; Monoterpenoids; GC-MS; Content determination

荆芥为唇形科一年生草本植物荆芥 *Schizonepeta tenuifolia* Briq.的干燥地上部分^[1],性温,味辛,具有祛风解表、宣毒透疹、散瘀止血之功效,为历版《中国药典》所收载。荆芥中挥发油含量较高,为其主要成分部位,具有较强的抗病毒、抗炎作用^[2-4]。2010年版《中国药典》(一部)只对荆芥饮片中挥发油含量进行了规定(不得少于0.30%),但作为市场上常见的中药提取物和植物香料,荆芥挥发油并无明确的质量控制方法。因此,本试验首次采用气相色谱-质谱(GC-MS)联用技术^[5]对荆

芥挥发油中6种单萜类化合物进行了结构辨认,并以其为指标建立了含量测定方法,为荆芥挥发油质量标准的制定提供依据。

1 材料

1.1 仪器

6890N-5975B型GC-MS联用仪、ChemStation化学工作站(美国Agilent公司);BP211D型电子天平[$d=0.01$ mg,赛多利斯科学仪器(北京)有限公司]。

1.2 试剂

Δ 基金项目:国家中医药管理局中医药行业科研专项资助课题(No.201007012-1-7);江苏省中医药局科技项目资助(No.LZ11118);江苏高校优势学科建设工程资助项目(No.ysxk-2010);南京中医药大学中药学一级学科开放课题(No.2011ZYX1-009)

* 副教授,硕士。研究方向:中药学。电话:025-85572939。E-mail:shanmingqiu@163.com

本栏目协办

江阴天江药业有限公司

地址:江苏省江阴市经济开发区秦望山路8号 电话:400 066 9211
传真:0510-86409611 网址: <http://www.tianjiang.com>

薄荷酮、胡薄荷酮对照品(中国食品药品检定研究院,批号分别为111705-201004、111706-201004); β -香叶烯对照品(美国Acros Organics公司,纯度:98%);D-柠檬烯(纯度:95%)、 β -石竹烯(纯度:98%)对照品均购自日本Tokyo Chemical Industrial公司;薄荷呋喃对照品(英国Alfa Aesar公司,纯度:98%);萘(内标,国药集团化学试剂有限公司,分析纯);甲醇为色谱纯,其余试剂均为分析纯。

1.3 药材

荆芥饮片均经南京中医药大学吴启南教授鉴定确认,饮片信息见表1。取荆芥饮片适量,照2010年版《中国药典》(一部)附录“挥发油提取法”甲法^[1]进行水蒸气蒸馏,提取完全后加入适量无水Na₂SO₄,静置1h,即得具有香味的黄色透明状挥发油。

表1 10批荆芥饮片信息

Tab 1 Information about 10 batches of *S. tenuifolia* decoction pieces

编号	产地	生产企业	批号
1	安徽	亳州市中药饮片厂	110202
2	安徽	安徽丰原铜陵中药饮片有限公司	110411
3	安徽	安徽国鑫中药饮片有限公司	110307
4	湖北	安徽德昌药业饮片有限公司	20110501
5	河北	安徽井泉集团中药饮片有限公司	110701
6	安徽	安徽维涛中药饮片科技有限公司	101201
7	江苏	南京鹿江中药饮片厂	20110818
8	江苏	徐州彭祖中药饮片有限公司	110601
9	江苏	苏州市天灵中药饮片有限公司	110606-1
10	湖北	湖北金贵中药饮片有限公司	090801

2 方法与结果

2.1 GC条件

色谱柱:HP-5MS毛细管柱(30 m×0.25 mm×0.25 μ m);载气:氦气(He);载气流速:1.0 ml/min;进样口温度:220 $^{\circ}$ C;程序升温:初始温度为50 $^{\circ}$ C,以10 $^{\circ}$ C/min升温至90 $^{\circ}$ C,保持15 min,再以5 $^{\circ}$ C/min升温至200 $^{\circ}$ C,保持5 min;进样量:1 μ l;分流比:20:1;溶剂延迟:3 min。在此色谱条件下,各待测成分之间分离情况良好。色谱见图1。

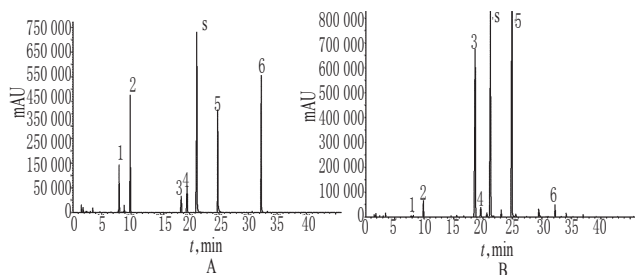


图1 气相色谱图

A.混合对照品;B.供试品;1. β -香叶烯;2.D-柠檬烯;3.薄荷酮;4.薄荷呋喃;5.胡薄荷酮;6. β -石竹烯;S.萘

Fig 1 GC-MS chromatograms

A. mixed control; B. test sample; 1. β -myrcene; 2. D-limonene; 3. menthone; 4. menthofuran; 5. pulegone; 6. β -caryophyllene; S. naphthalene

2.2 MS条件

离子源:电轰击电离源(EI);电子能量:70 eV;四级杆温度:150 $^{\circ}$ C;离子源温度:230 $^{\circ}$ C;接口温度:280 $^{\circ}$ C;质量扫描范围(m/z):40~400 amu;扫描速率:0.20 s/scan。6种待测化合物的MS监测数据见表2。

表2 荆芥挥发油中6种化合物的MS监测数据

Tab 2 MS data of 6 compounds in *S. tenuifolia*

编号	化合物	保留时间,min	分子量	分子式	MS碎片
1	β -香叶烯	8.12	136.23	C ₁₀ H ₁₆	27,41,93,136
2	D-柠檬烯	9.80	136.24	C ₁₀ H ₁₆	69,79,136
3	薄荷酮	18.46	154.25	C ₁₀ H ₁₆ O	69,112,139,154
4	薄荷呋喃	19.35	150.22	C ₁₀ H ₁₄ O	79,108,150
5	胡薄荷酮	24.76	152.23	C ₁₀ H ₁₆ O	105,112,137,152
6	β -石竹烯	32.15	204.36	C ₁₅ H ₂₄	105,120,133,204

2.3 内标溶液的制备

取萘适量,加甲醇溶解并稀释制成每1 ml中含5 mg的溶液,即得。

2.4 供试品溶液的制备

取荆芥挥发油100 mg,精密称定,置于10 ml量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,精密量取该溶液5 ml和内标溶液1 ml,置于10 ml量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,即得。

2.5 混合对照品溶液的制备

精密称取对照品 β -香叶烯3.18 mg、D-柠檬烯42.26 mg、薄荷酮351.68 mg、薄荷呋喃19.34 mg、胡薄荷酮611.20 mg、 β -石竹烯7.98 mg,置于同一10 ml量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,即得。

2.6 线性关系考察

分别精密量取混合对照品溶液0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 ml,置于10 ml量瓶中,分别精密加入内标溶液1 ml,再加甲醇稀释至刻度,摇匀。吸取上述溶液各1 μ l,注入GC仪测定,记录峰面积。以各待测化合物与内标的峰面积比值(y)为纵坐标,各待测化合物质量浓度(x , mg/ml)为横坐标,进行线性回归,得回归方程。各化合物线性关系考察结果见表3。

表3 各化合物线性关系考察结果($n=6$)

Tab 3 Linear range of each compound($n=6$)

化合物	回归方程	r	线性范围,mg/ml
β -香叶烯	$y=6.7840x+3.8584 \times 10^{-3}$	0.9993	0.00318~0.03180
D-柠檬烯	$y=0.6119x+2.1104 \times 10^{-4}$	0.9998	0.04226~0.42260
薄荷酮	$y=0.9940x+1.9389 \times 10^{-2}$	0.9994	0.35168~3.51680
薄荷呋喃	$y=0.9268x+3.8718 \times 10^{-4}$	0.9997	0.01934~0.19340
胡薄荷酮	$y=0.7285x+1.3109 \times 10^{-2}$	0.9999	0.61120~6.11200
β -石竹烯	$y=1.0232x+3.6877 \times 10^{-4}$	0.9995	0.00798~0.07980

2.7 稳定性试验

取同一荆芥饮片(编号:1)的供试品溶液适量,照上述试验条件分别于0、1、2、4、6、8 h进样测定,记录峰面积,计算各待测化合物与内标的峰面积比值。结果,6种化合物的RSD为0.85%~2.16%(n 均为6),表明供试品溶液在8 h内稳定。

2.8 精密度试验

取同一饮片(编号:1)的供试品溶液适量,照上述试验条件连续测定6次,记录峰面积,计算各待测化合物与内标的峰面积比值。结果,6种化合物的RSD为1.42%~2.59%(n 均为6),表明本方法精密度良好。

2.9 重复性试验

取同一批(编号:1)荆芥饮片适量,共6份,分别按“1.3”项下方法提取挥发油,照“2.4”项下方法制备供试品溶液,按上述试验条件进样测定,记录峰面积,以各待测化合物与内标的峰面积比值按内标法计算含量。结果, β -香叶烯、D-柠檬烯、薄荷酮、薄荷呋喃、胡薄荷酮、 β -石竹烯的平均质量分数分别为0.3092%、4.184%、34.79%、1.971%、55.50%、0.7699%,RSD

为1.01%~1.83%(*n*均为6),表明本方法重复性良好。

2.10 加样回收率试验

取同一批(编号:1)荆芥饮片适量,共6份,分别按“1.3”项下方法提取挥发油,各取50 mg,精密称定,置于10 ml量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀。精密量取该溶液5 ml、内标溶液1 ml与混合对照品溶液0.25 ml,置于10 ml量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,即得加样回收率试验的供试品溶液。照上述试验条件进样测定,以各待测化合物与内标的峰面积比值按内标法计算样品含量,再计算加样回收率,结果见表4。

表4 各化合物的加样回收率试验结果(*n*=6)

Tab 4 Results of recovery test of each compound(*n*=6)

化合物	称样量,mg	样品含量,mg	加入量,mg	测得量,mg	回收率,%	\bar{x} ,%	RSD,%
β -香叶烯	50.65	77.42	79.50	156.26	99.17	99.22	0.86
	51.26	78.35	79.50	157.63	99.72		
	49.44	75.57	79.50	155.09	100.03		
	50.38	77.01	79.50	156.28	99.72		
	51.07	78.06	79.50	155.69	97.65		
D-柠檬烯	51.11	78.12	79.50	156.85	99.03	98.34	0.92
	50.65	1 047.19	1 056.50	2 089.55	98.66		
	51.26	1 059.80	1 056.50	2 079.49	96.52		
	49.44	1 022.17	1 056.50	2 063.17	98.53		
	50.38	1 041.61	1 056.50	2 085.66	98.82		
薄荷酮	51.07	1 055.87	1 056.50	2 100.82	98.91	98.05	2.28
	51.11	1 056.70	1 056.50	2 098.41	98.60		
	50.65	8 744.72	8 792.00	17 153.99	95.65		
	51.26	8 850.04	8 792.00	17 712.94	100.81		
	49.44	8 535.82	8 792.00	16 969.37	95.92		
薄荷呔喃	50.38	8 698.11	8 792.00	17 194.96	96.64	97.56	1.21
	51.07	8 817.24	8 792.00	17 550.33	99.33		
	51.11	8 824.14	8 792.00	17 609.24	99.92		
	50.65	494.85	483.50	973.09	98.91		
	51.26	500.81	483.50	970.47	97.14		
胡薄荷酮	49.44	483.03	483.50	962.11	99.09	98.22	1.61
	50.38	492.21	483.50	960.25	96.80		
	51.07	498.95	483.50	969.34	97.29		
	51.11	499.34	483.50	964.21	96.15		
	50.65	13 946.48	15 280.00	28 964.06	98.28		
β -石竹烯	51.26	14 114.44	15 280.00	28 766.53	95.89	99.06	1.17
	49.44	13 613.30	15 280.00	28 990.84	100.64		
	50.38	13 872.13	15 280.00	29 008.30	99.06		
	51.07	14 062.12	15 280.00	28 990.77	97.70		
	51.11	14 073.14	15 280.00	29 010.36	97.76		
β -石竹烯	50.65	193.56	199.50	392.00	99.47	99.06	1.17
	51.26	195.89	199.50	390.18	97.39		
	49.44	188.93	199.50	389.22	100.39		
	50.38	192.53	199.50	388.57	98.27		
	51.07	195.16	199.50	392.05	98.69		
51.11	195.32	199.50	395.11	100.15			

2.11 样品含量测定

取各批荆芥饮片适量,每批3份,分别按“1.3”项下方法提取挥发油,照“2.4”项下方法制备供试品溶液,按上述试验条件进样测定,记录峰面积,以各化合物与内标的峰面积比值按内标法计算样品含量,结果见表5。

表5 样品含量测定结果(% ,*n*=3)

Tab 5 Results of content determination of samples(% ,*n*=3)

样品编号	β -香叶烯	D-柠檬烯	薄荷酮	薄荷呔喃	胡薄荷酮	β -石竹烯
1	0.305 7	4.135	34.53	1.954	55.07	0.764 3
2	0.285 1	3.612	23.69	1.434	64.25	0.569 4
3	0.320 1	3.115	24.86	1.039	65.56	0.899 1
4	0.735 4	2.346	19.47	1.994	71.72	0.355 2
5	0.218 1	1.819	43.60	1.106	47.86	0.501 6
6	0.245 2	1.873	33.21	3.455	59.84	0.242 3
7	0.271 3	1.757	44.22	0.988	49.98	0.298 1
8	0.450 3	2.430	19.79	0.569	74.19	0.506 0
9	0.280 8	4.878	25.79	2.780	61.71	0.591 8
10	0.686 2	3.798	26.11	3.298	58.16	0.516 6

3 讨论

从GC-MS图和含量测定结果来看, β -香叶烯、D-柠檬烯、薄荷酮、薄荷呔喃、胡薄荷酮和 β -石竹烯这6种单萜类化合物在荆芥挥发油中占有很高的比例,为其主要成分,因此在本试验中选择它们作为含量测定的指标性成分。

本试验考察了不同毛细管柱[HP-1MS(30 m×0.25 mm×0.25 μ m)、HP-5MS(30 m×0.25 mm×0.25 μ m)、DB-WAX(30 m×0.25 mm×0.25 μ m)等]对分离效果的影响。结果表明,使用HP-5MS毛细管柱(30 m×0.25 mm×0.25 μ m)时,6种单萜类化合物与内标之间能获得良好的分离效果。

本试验结果显示,各批荆芥饮片所得挥发油中6种单萜类化合物的质量分数差异很大,这可能与原药材的产地、采收时间、产地初加工方式、饮片炮制工艺等多方面的因素有关,由此会导致批间质量差异以致疗效差异。而荆芥挥发油作为常用提取物,经常是制备中成药和天然香料的原料,市场占有率较高。因此,有必要对其进行严格的质量控制。

综上,本方法专属性强、准确度高、重复性好,可用于荆芥挥发油的质量控制,为其质量标准的制定提供可靠的依据。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 2010年版. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 216、附录63.
- [2] 解宇环, 沈映君, 金沈锐, 等. 荆芥挥发油对急性肺损伤大鼠肺组织病理形态及NF- κ B、I κ B含量的影响[J]. 华西药理学杂志, 2008, 23(3): 274.
- [3] 赵璐, 曾南, 唐永鑫, 等. 荆芥挥发油对大鼠胸腔白细胞5-脂氧酶活性的影响[J]. 中国中药杂志, 2008, 33(17): 2 154.
- [4] 解宇环, 沈映君, 金沈锐. 荆芥挥发油对流感病毒性肺炎小鼠Myd88、TRAF6蛋白表达影响[J]. 中药药理与临床, 2007, 23(5): 98.
- [5] 李澎灏, 陈振德. 牵牛子脂肪油超临界CO₂萃取及气相-质谱测定[J]. 中国药房, 2003, 14(7): 431.

(收稿日期: 2012-05-02 修回日期: 2012-11-06)