

一测多评法同时测定连翘挥发油中4种有效成分的含量[△]

吴婷^{1,2*}, 谭丽媛², 王旭文³, 翟康欣², 陈瑾², 裴香萍², 周永刚¹, 张玉华¹, 魏珊³, 张淑蓉^{2#} (1. 南京中医药大学附属八一医院药学科, 南京 210002; 2. 山西中医药大学中药学院, 山西晋中 030619; 3. 山西振东安特生物制药有限公司, 山西晋中 030619)

中图分类号 R932; R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)14-1981-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.14.22

摘要 目的: 建立同时测定连翘挥发油中 α -蒎烯、 β -蒎烯、柠檬烯和 α -松油醇含量的方法。方法: 采用气相色谱法进行测定。色谱柱为HP-5毛细管色谱柱, 程序升温, 进样口温度为230℃, 检测器温度为250℃, 分流进样(分流比为8:1), 空气流速为300 mL/min, 氢气流速为30 mL/min, 尾吹气流速为30 mL/min, 进样体积为1 μ L。以柠檬烯为内参物, 建立 α -蒎烯、 β -蒎烯、 α -松油醇的相对校正因子, 分别采用不同色谱仪和色谱柱以及待测成分色谱峰定位考察相对校正因子及相对保留时间的重现性; 以一测多评法计算4种成分的含量, 同时将其与外标法测定结果进行比较。结果: α -蒎烯、 β -蒎烯、柠檬烯、 α -松油醇检测质量浓度的线性范围分别为16.5~990.0、38.1~2 287.5、8.2~491.2、2.4~142.5 μ g/mL ($r \geq 0.999$); 精密度、重复性、稳定性试验的RSD均小于3% ($n=6$); 平均回收率为99.7%~105.5% (RSD<4%, $n=9$)。相对于柠檬烯(1.00), α -蒎烯、 β -蒎烯、 α -松油醇的相对校正因子平均值分别为0.91、0.86、1.11 ($n=3$); 其相对保留时间分别为0.69~0.74、0.81~0.86、1.25~1.35 (RSD<3%, $n=3$); 在不同色谱仪或色谱柱条件下其相对校正因子的RSD为0.21%~4.65% ($n=6$)。采用上述方法测得4种成分的含量与外标法测定结果基本一致(相对误差绝对值均小于7%)。结论: 一测多评法可用于连翘挥发油中4种有效成分的同时测定。

关键词 连翘; 挥发油; 一测多评法; 相对校正因子; 气相色谱法

Simultaneous Determination of 4 Kinds of Effective Components in Volatile Oil of *Forsythia suspensa* by QAMS

WU Ting^{1, 2}, TAN Liyuan², WANG Xuwen³, ZHAI Kangxin², CHEN Jin², PEI Xiangping², ZHOU Yonggang¹, ZHANG Yuhua¹, WEI Shan³, ZHANG Shurong² (1. Dept. of Pharmacy, No.81 Hospital Affiliated to Nanjing University of TCM, Nanjing 210002, China; 2. College of TCM, Shanxi University of TCM, Shanxi Jinzhong 030619, China; 3. Shanxi Zhendong Ante Biological Pharmaceutical Co., Ltd., Shanxi Jinzhong 030619)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for simultaneous determination of α -pinene, β -pinene, limonene and α -terpineol in volatile oil of *Forsythia suspensa*. METHODS: GC method was adopted. The determination was performed on HP-5 capillary column through temperature-programmed route. The inlet temperature was 230 $^{\circ}$ C, and detector temperature was 250 $^{\circ}$ C; split sampling was applied (split ratio of 8:1); the air flow rate was 300 mL/min, the hydrogen flow rate was 30 mL/min, the tail gas flow rate was 30 mL/min, and the injection volume was 1 μ L. Using limonene as internal reference, relative correction factors of α -pinene, β -pinene and α -terpineol were established, and the reproducibility of relative correction factors were investigated by using different chromatographs and columns, and chromatographic peak location of components was measured. The contents of above components were calculated with QAMS, and then compared with the results of external standard method. RESULTS: The linear range of α -pinene, β -pinene, limonene and α -terpineol were 16.5-990.0, 38.1-2 287.5, 8.2-491.2, 2.4-142.5 μ g/mL, respectively ($r \geq 0.999$). RSDs of precision, reproducibility and stability tests were all lower than 3% ($n=6$). Average recoveries were 99.7%-105.5% (RSD<4%, $n=9$). Compared with limonene (1.00), the average relative correction factors of α -pinene, β -pinene and α -terpineol were 0.91, 0.86 and 1.11 ($n=3$); relative retention time were 0.69-0.74, 0.81-0.86, 1.25-1.35 (RSD<3%, $n=3$). By using different chromatographs and columns, RSDs of relative correction factors were 0.21%-4.65% ($n=6$). Compared with external standard method, determination results of above 4 components were consistent (the absolute value of relative error were all less than 7%). CONCLUSIONS: QAMS can be used for simultaneous determination of 4 kinds of effective components in volatile oil from *F. suspensa*.

* 药师, 硕士。研究方向: 中药活性成分分析及其质量标准。电话: 025-80864551。E-mail: wutingyaya@163.com

通信作者: 教授, 硕士生导师。研究方向: 中药活性成分分析及其药效物质基础。电话: 0351-3179903。E-mail: zhangsr62@163.com

连翘为木犀科植物连翘 [*Forsythia suspensa* (Thunb.) Vahl] 的干燥果实, 具有清热解毒、消肿散结等多种功效, 是临床常用的中药材, 常作为如小儿退热颗粒、抗病毒口服液、双黄连制剂等中成药的主要组成药味^[1-2]。连翘果实含有丰富的挥发油, 其挥发油中的有效成分主要包括 α -蒎烯、 β -蒎烯等, 具有广谱的抗菌、抗病毒、抗氧化等作用^[3-7]。目前对连翘挥发油进行含量测定的方法多为外标法 (ESM) 和内标法^[5-6, 8-9], 但上述方法在对大批量连翘挥发油进行多指标含量测定时, 常由于对照品货源不足或价格昂贵, 使得其实际应用受限。基于此, 为大幅度降低连翘药材质量控制的成本, 提高其检测效率, 本研究以连翘挥发油的主要成分之一, 即结构相对稳定、价格相对低廉的柠檬烯作为内参物, 采用一测多评法 (QAMS) 同时测定连翘挥发油中 α -蒎烯、 β -蒎烯、柠檬烯和 α -松油醇等4个有效成分的含量, 并与外标法测定结果进行比较, 为连翘药材及相应制剂的质量控制及标准提升提供方法基础。

1 材料

1.1 仪器

FA224型电子分析天平(万分之一, 上海舜宇平科学仪器有限公司); AB135-S型电子天平(十万分之一, 瑞士Mettler-Toledo公司); 7890A型气相色谱仪、4890D型气相色谱仪、HP-5毛细管色谱柱(30 m \times 0.25 mm, 0.25 μ m)、DB-5毛细管色谱柱(30 m \times 0.25 mm, 0.25 μ m)均购自美国Agilent公司。

1.2 药品与试剂

α -蒎烯对照品(批号:P110875, 纯度: $>98\%$)、 β -蒎烯对照品(批号:P108923, 纯度: $>98\%$)均购自上海阿拉丁试剂有限公司; 柠檬烯对照品(批号:IC01ZA, 纯度: $>95.0\%$)、 α -松油醇对照品(批号:IC02ZA, 纯度: $>95.0\%$)购自上海梯希爱化成工业有限公司; 乙酸乙酯、无水硫酸钠等为优级纯, 其余试剂均为分析纯, 水为超纯水。

1.3 药材

16批连翘药材分别采集于山西、河南、河北、陕西, 经山西中医药大学中药学院中药鉴定教研室裴香萍副教授鉴定, 均为木犀科植物连翘 [*F. suspensa* (Thunb.) Vahl] 的干燥果实。药材来源信息详见表1。

表1 连翘药材来源信息

Tab 1 Sources of *Forsythia suspensa*

编号	采收产地	采收时间	编号	采收产地	采收时间
S1	山西省太原市	20120723	S9	山西省太谷县	20120811
S2	山西省太原市	20120718	S10	山西省平遥县	20120726
S3	山西省绛县	20120723	S11	河北省涉县	20120725
S4	山西省左权县	20120727	S12	河北省涉县	20120720
S5	山西省安泽县	20120727	S13	河南省卢氏县	20120723
S6	山西省晋城市	20120710	S14	河南省卢氏县	20120715
S7	山西省长治市	20120804	S15	陕西省商洛市	20120718
S8	山西省长治市	20120721	S16	陕西省韩城市	20120724

2 方法与结果

2.1 连翘挥发油中4种有效成分含量测定方法的建立

采用QAMS法以7890A型气相色谱仪同步测定。

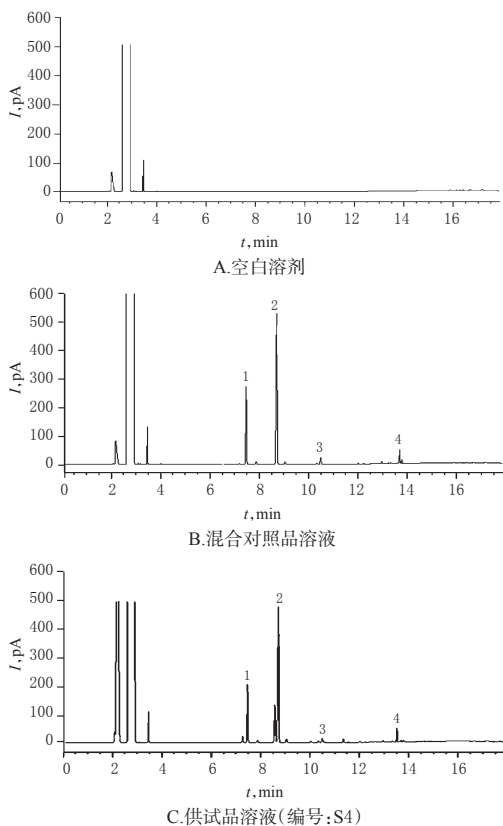
2.1.1 色谱条件 色谱柱: HP-5毛细管色谱柱(30 m \times 0.25 mm, 0.25 μ m); 程序升温(初始温度50 $^{\circ}$ C, 以5 $^{\circ}$ C/min的速率升至86 $^{\circ}$ C, 保持3 min; 再以20 $^{\circ}$ C/min的速率升至220 $^{\circ}$ C, 保持1 min); 进样口温度: 230 $^{\circ}$ C; 检测器温度: 250 $^{\circ}$ C; 分流进样, 分流比: 8:1; 空气流速: 300 mL/min; 氢气流速: 30 mL/min; 尾吹气流速: 30 mL/min; 进样体积: 1 μ L; 运行时间: 17.9 min。

2.1.2 溶液制备 (1)供试品溶液: 将连翘药材粉碎成粗粉(60目), 精密称取粗粉100 g, 置于圆底烧瓶中, 加水700 mL浸泡30 min, 用水蒸气蒸馏法连续回流5 h提取挥发油; 将收集到的挥发油用无水硫酸钠干燥后, 除去固体不溶物, 精密称定, 4 $^{\circ}$ C避光保存。精密称取连翘挥发油16.90 mg, 置于10 mL量瓶中, 用乙酸乙酯稀释至刻度, 摇匀, 即得, 密封冷藏, 备用。(2)混合对照品溶液: 精密称取 α -蒎烯、 β -蒎烯、柠檬烯、 α -松油醇对照品各适量, 置于同一10 mL量瓶中, 用乙酸乙酯稀释至刻度并摇匀, 即得上述成分质量浓度分别为2.64、6.10、1.31、0.38 mg/mL的混合对照品溶液, 密封冷藏, 备用。

2.1.3 专属性试验 分别精密量取空白溶剂(乙酸乙酯)、“2.1.2(2)”项下混合对照品溶液、供试品溶液(编号:S4)适量, 按“2.1.1”项下色谱条件进样测定, 记录色谱图。结果, 各成分的色谱峰均能达到基线分离, 专属性较好, 详见图1。

2.1.4 线性关系考察 用微量移液器分别精密量取“2.1.2(2)”项下混合对照品溶液0.012 5、0.037 5、0.062 5、0.250 0、0.750 0 mL, 置于2 mL量瓶中, 用乙酸乙酯稀释至刻度, 摇匀, 制成不同质量浓度的系列线性混合对照品溶液。分别精密量取上述系列溶液1 μ L, 按“2.1.1”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积。以待测物质量浓度(x, μ g/mL)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归。结果, α -蒎烯的回归方程为 $y=2.223 6x+0.026 2$ ($r=0.999 3$), 其检测质量浓度的线性范围为16.5~990.0 μ g/mL; β -蒎烯的回归方程为 $y=2.176 7x+0.037 7$ ($r=0.999 6$), 表明其检测质量浓度的线性范围为38.1~2 287.5 μ g/mL; 柠檬烯的回归方程为 $y=2.544 9x+0.016 4$ ($r=0.999 2$), 表明其检测质量浓度的线性范围为8.2~491.2 μ g/mL; α -松油醇的回归方程为 $y=2.913 6x+0.092 9$ ($r=0.999 1$), 表明其检测质量浓度的线性范围为2.4~142.5 μ g/mL。

2.1.5 精密度试验 精密量取“2.1.2(2)”项下混合对照品溶液0.062 5 mL, 置于2 mL量瓶, 用乙酸乙酯稀释、定容, 按“2.1.1”项下色谱条件连续进样测定6次。结果, α -蒎烯、 β -蒎烯、柠檬烯、 α -松油醇峰面积的RSD分别为0.56%、0.82%、2.48%、1.70% ($n=6$), 表明仪器精密度良好。



注:1. α -蒎烯;2. β -蒎烯;3. 柠檬烯;4. α -松油醇
Note: 1. α -pinene; 2. β -pinene; 3. limonene; 4. α -terpineol

图1 连翘挥发油气相色谱图

Fig 1 GC chromatograms of volatile oil from *F. sus-pensa*

2.1.6 重复性试验 取同一批连翘药材粗粉(编号:S4),精密称定,平行操作6份,按“2.1.2(1)”项下方法提取挥发油并制备供试品溶液,再按“2.1.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并按标准曲线法计算各待测成分的含量。结果, α -蒎烯、 β -蒎烯、柠檬烯、 α -松油醇的含量RSD分别为0.01%、2.54%、2.58%、2.06%($n=6$),表明该方法重复性良好。

2.1.7 稳定性试验 取同一供试品溶液(编号:S4),分别于4℃冷藏条件下放置0、2、4、6、8、10 h时按“2.1.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果, α -蒎烯、 β -蒎烯、柠檬烯、 α -松油醇峰面积的RSD分别为1.73%、2.09%、1.00%、0.52%($n=6$),表明供试品溶液在4℃条件下放置10 h内稳定性良好。

2.1.8 加样回收率试验 取连翘药材粗粉(编号:S4),按“2.1.2(1)”项下方法提取连翘挥发油;称取所得挥发油17 mg,精密称定,置于10 mL量瓶中,平行操作9份,分别精密加入“2.1.2(2)”项下混合对照品溶液适量,加乙酸乙酯稀释至刻度,摇匀,按“2.1.1”项下色谱条件进样测定,并按标准曲线法计算各待测成分含量及加样回收率。结果, α -蒎烯、 β -蒎烯、柠檬烯、 α -松油醇的平均回

收率分别为101.6%、99.7%、105.5%、104.1%,RSD分别为1.28%、0.92%、3.54%、3.50%($n=9$),表明该方法准确度良好。

2.1.9 相对校正因子的计算 取同一批连翘药材(编号:S4),精密称定,平行操作3份,按“2.1.2(1)”项下方法提取连翘挥发油并制备供试品溶液,再按“2.1.1”项下色谱条件进样测定。以柠檬烯为内参物,按公式计算其他各待测成分的相对校正因子: $f_{k/si} = f_k/f_{si} = (W_k \times A_{si}) / (W_{si} \times A_k)$ 。式中, A_k 为内参物峰面积, W_k 为内参物的质量, A_{si} 为其他*i*组分的峰面积, W_{si} 为其他*i*组分的质量。结果, α -蒎烯、 β -蒎烯、 α -松油醇的相对校正因子平均值分别为0.91、0.86、1.11($n=3$)。

2.2 相对校正因子和相对保留时间的重现性考察

2.2.1 不同色谱仪和不同色谱柱的考察 固定其他色谱条件不变,在两套不同的色谱仪器系统(7890A型气相色谱仪、4890D型气相色谱仪)和两种不同的色谱柱[HP-5毛细管柱(30 m×0.25 mm,0.25 μ m)、DB-5毛细管柱(30 m×0.25 mm,0.25 μ m)]条件下对相对校正因子进行考察,均平行操作6次。结果, α -蒎烯、 β -蒎烯、 α -松油醇的相对校正因子的RSD为0.21%~4.65%($n=6$),表明上述3种成分与内参物柠檬烯间相对校正因子的重现性良好。

2.2.2 待测组分色谱峰的定位 采用相对保留时间作为色谱峰定位标准,结合峰形即能够正确判断出目标峰的准确位置^[10-12],按“2.2.1”项下方法考察不同色谱仪和不同色谱柱条件下的重现性。结果,以柠檬烯为内参物时, α -蒎烯、 β -蒎烯、 α -松油醇的相对保留时间分别为0.69~0.74、0.81~0.86、1.25~1.35,RSD分别为0.98%、1.26%、2.69%($n=6$),表明上述3种成分与内参物柠檬烯间相对保留时间重现性良好。

2.3 QAMS法与ESM法测定连翘挥发油中4种成分的结果比较

取16批连翘药材粗粉,按“2.1.2(1)”项下方法提取连翘挥发油并制备供试品溶液。分别采用QAMS法和ESM法^[9],对 α -蒎烯、 β -蒎烯、柠檬烯、 α -松油醇进行色谱峰定位及含量测定(以质量分数表示),每批样品均平行测定3次。将两种方法测定结果进行比较,计算其相对误差[RE, RE=(含量_{QAMS法}-含量_{ESM法})/含量_{ESM法}×100%],以验证QAMS法的可靠性,详见表2(注:表中RE值为“0.00”者均表示其绝对值小于0.01%;因柠檬烯作为内参物,故其QAMS法与ESM法的测定结果数据相同,RE值略去)。由表2可见,两种方法测定结果比较, α -蒎烯含量RE为-4.23%~-3.60%, β -蒎烯含量RE为-0.29%~-0.15%, α -松油醇含量RE为0.00%~6.27%。同时采用SPSS 13.0统计学软件对两种方法测

定数据进行 *t* 检验比较后显示, *P* 值均大于 0.05, 提示这两种方法的测定结果组间比较, 差异均无统计学意义, 建立的相对校正因子具有较好的可信度, 因此 QAMS 法应用于连翘挥发油多指标成分的含量测定具有可行性。

表2 QAMS法和ESM法测定16批连翘药材挥发油中4种成分平均含量的结果比较(*n*=3)

Tab 2 Comparison of average contents of 4 components in volatile oil from 16 batches of *F. suspensa* between QAMS and ESM (*n*=3)

编号	α -蒎烯, %			β -蒎烯, %			柠檬烯, %	α -松油醇, %		
	QAMS法	ESM法	RE	QAMS法	ESM法	RE	QAMS法/ESM法	QAMS法	ESM法	RE
S1	0.296	0.308	-3.90	0.950	0.952	-0.21	0.027	0.004	0.004	0.00
S2	0.301	0.314	-4.14	0.956	0.958	-0.21	0.027	0.003	0.003	0.00
S3	0.290	0.302	-3.97	0.902	0.904	-0.22	0.027	0.003	0.003	0.00
S4	0.269	0.280	-3.93	0.875	0.877	-0.23	0.026	0.016	0.015	6.67
S5	0.323	0.336	-3.87	1.024	1.026	-0.19	0.029	0.003	0.003	0.00
S6	0.195	0.203	-3.94	0.987	0.989	-0.20	0.015	0.018	0.017	5.88
S7	0.270	0.281	-3.91	0.964	0.966	-0.21	0.018	0.011	0.011	0.00
S8	0.228	0.238	-4.20	0.722	0.724	-0.28	0.003	0.010	0.010	0.00
S9	0.204	0.213	-4.23	0.822	0.824	-0.24	0.011	0.006	0.006	0.00
S10	0.216	0.225	-4.00	0.769	0.771	-0.26	0.008	0.004	0.004	0.00
S11	0.098	0.102	-3.92	0.628	0.629	-0.16	0.020	0.009	0.009	0.00
S12	0.122	0.127	-3.94	0.684	0.685	-0.15	0.021	0.010	0.010	0.00
S13	0.187	0.195	-4.10	0.588	0.589	-0.17	0.017	0.008	0.008	0.00
S14	0.190	0.198	-4.04	0.595	0.596	-0.17	0.017	0.009	0.009	0.00
S15	0.107	0.111	-3.60	0.342	0.343	-0.29	0.009	0.009	0.009	0.00
S16	0.152	0.158	-3.80	0.460	0.461	-0.22	0.012	0.003	0.003	0.00

3 讨论

本课题组前期分别对连翘挥发油提取过程中的药材粉碎粒度、水用量、提取方法、提取压力、提取温度和提取时间等进行了正交试验考察^[5,8-9], 确定了本试验中的挥发油提取方法; 同时, 对气相色谱法的进样分流比、样品配制浓度及升温程序等进行了考察, 最终确定了本试验的色谱条件。结果显示, 在本试验色谱条件下, α -蒎烯、 β -蒎烯、柠檬烯、 α -松油醇等4种成分均能够实现完全分离, 且峰形较好; 线性关系、精密度、重复性、稳定性、准确度均良好, 表明方法可靠。柠檬烯与其他3种成分间相对校正因子的RSD为0.21%~4.65%, 表明所建立的QAMS法在不同色谱系统和不同色谱柱条件下重现性均良好; 同时, 4种待测成分在不同仪器和色谱柱上出峰时间虽有所变化, 但各成分的相对保留时间变化不大(RSD<3%), 因此采用相对保留时间进行成分色谱峰定位能较好地避免试验条件变化对测定结果的干扰。

QAMS法的原理是通过中药有效成分间存在的内在比例关系, 仅通过测定某一内参物成分(内参物要求其化学性质比较稳定、来源有保证、廉价易得)的含量来实现多个成分(相应对照品缺失或价高难以持续供应等)的同步定量分析^[10]。因此, 本研究选择连翘挥发油

成分中稳定、价廉、易获得的柠檬烯为内参物, 结果显示其能够准确对 α -蒎烯、 β -蒎烯和 α -松油醇进行色谱峰定位; 且对这4种成分的含量测定结果显示, QAMS法所测结果与传统常用ESM法所得实测值基本一致, 差异均无统计学意义, 表明QAMS法用于连翘挥发油中多成分含量同步测定合理、可靠、重复性好, 具有简便、易操作、低成本的特点, 能避免内标法需寻找内标物以及外标法对照品不易获得、操作相对繁琐等缺点。

综上, 本研究建立的测定连翘挥发油中4种有效成分含量的QAMS法, 可用于连翘药材和相应制剂的质量控制, 在未来中药挥发油多指标质量评价中也有望得到更广泛的应用。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部[S]. 2015年版. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 170、545、735-740、957.
- [2] 熊艳, 朱晶晶, 王智民, 等. 连翘及其制剂的分析方法研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2009, 15(7): 97-99.
- [3] 孟祥乐, 李俊平, 李丹, 等. 连翘的化学成分及其药理活性研究进展[J]. 中国药房, 2010, 21(43): 4117-4119.
- [4] 徐坤. 连翘果实挥发油的分离抑菌研究及固体脂质纳米粒的制备[D]. 西安: 西北大学, 2012.
- [5] 魏珊, 吴婷, 李敏, 等. 不同产地连翘挥发油主要成分分析及抗菌活性研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(4): 69-74.
- [6] 肖会敏, 何悦, 王四旺, 等. 连翘挥发油的成分分析及抗病毒活性的考察[J]. 中国医药导报, 2011, 8(8): 31-33.
- [7] 秦宇, 张文丽, 林媛媛, 等. 连翘化学成分与抗氧化活性研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(10): 149-152.
- [8] 裴晓丽, 张淑蓉, 王秀文, 等. 不同产地连翘中挥发油及其 β -蒎烯含量的比较研究[J]. 药物分析, 2010, 30(1): 127-129.
- [9] 张淑蓉, 裴晓丽, 王华阳. 不同采收期连翘挥发油中 α -蒎烯和 β -蒎烯含量的比较[J]. 中国药房, 2013, 24(47): 4469-4471.
- [10] 王智民, 高慧敏, 付雪涛, 等. “一测多评”法中药质量评价模式方法学研究[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(23): 1925-1928.
- [11] 张淑蓉, 吴婷, 魏珊, 等. 以连翘苷为内参物的一测多评法用于山西连翘药材品质评价研究[J]. 中国现代应用药学, 2016, 33(3): 304-308.
- [12] 何兵, 刘艳, 李春红, 等. 一测多评法同时测定鱼腥草不同部位中6种活性成分的量[J]. 中草药, 2013, 44(15): 2160-2164.

(收稿日期: 2019-01-07 修回日期: 2019-06-12)

(编辑: 段思怡)