

逍遥丸指纹图谱和掺伪检验方法的建立

姚立山 郝满霞

(郑州大学附属医院南阳中心医院中药科, 南阳, 473009)

摘要 目的:建立掺伪检验方法分析逍遥丸指纹图谱。方法:首先淹没逍遥丸制成粉末待用,试验相关的混合对照品溶液和供试品溶液,通过专属性试验、线性关系分析、精密度、重复性和稳定性试验以及加样回收率试验考察逍遥丸指纹图谱方法的严谨性,采用气相色谱法(GC法)和气相色谱法-质谱法联用法(GC-MS法)检测样品中薄荷脑和香芹酮的含量,并建立掺伪检验方法。结果:专属性、线性关系、精密度、重复性和稳定性和加样回收率试验结果均显示良好。A厂逍遥丸供试品中未检出香芹酮,而B、C厂均检测出含有香芹酮,且C厂香芹酮PA值高于B厂。薄荷脑和香芹酮的GC-MS特征离子峰分别是 m/z 41、55、71、81、95和 m/z 39、54、82、93、108。结论:基于建立掺伪检验方法对逍遥丸进行指纹图谱检测,可有效控制其药物质量。

关键词 逍遥丸;指纹图谱;掺伪检验;气相色谱法;质谱法;线性关系;专属性试验;稳定性试验

Establishment of Fingerprint and Adulteration Test Method of Xiaoyao Pill

Yao Lishan, Hao Manxia

(Chinese Medicine Department, Nanyang Central Hospital, Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 473009, China)

Abstract Objective: To study the fingerprint of Xiaoyao Pill on the basis of adulteration test method. **Methods:** Powder of Xiaoyao Pill was submerged for preparation, and mixed control solution and the test solution was prepared. The precise of Xiaoyao Pill fingerprint method was tested through the specificity test, linear correlation analysis, precision, repeatability and stability test and recovery test. The menthol and carvone in the sample was tested by gas chromatography (GC), gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS), and adulteration detection method was established. **Results:** 1) The test results of specificity, linearity, precision, repeatability, stability and sample recovery were all good. 2) Carvone was not detected in samples of Xiaoyao Pill from A factory, and detected in the samples from B and C factory. PA of carvone in samples from C factory was higher than that of B factory. 3) According to GC-MS chromatogram, the results showed that GC-MS characteristic peaks of menthol and carvone were m/z 41, 55, 71, 81, 95 and 39, 54, 82, 93, 108 using positive ion mode. **Conclusion:** The fingerprint detection of Xiaoyao Pill on the basis of adulteration test method can effectively control drug quality.

Key Words Xiaoyao Pill; Fingerprint; Adulteration Test; Gas Chromatography; Mass spectrometry; Linear relationship analysis; Specificity test; Stability test

中图分类号: R289.4 文献标识码: A doi: 10.3969/j.issn.1673-7202.2018.12.056

在国家药品评价抽样、常规药材市场调研进行薄荷药材的抽检考察中发现,薄荷存在同科的留兰香代用或者混用的情况^[1-3];逍遥丸的主要适应证是肝郁气滞及脾虚血虚的患者,其出处为宋代《太平惠民和剂局方》,方中以柴胡疏肝解郁,恢复肝脏条达、疏泄之性,当归、白芍养血柔肝濡养肝脏,增强其藏血之功;白术、茯苓健脾去湿,后天之本得以巩固,患者神疲症状减轻,《灵枢·平人绝谷篇》有云:“神者,水谷之精气也”。脾运化有权,统气血有司,脾土养肝,缓肝气横逆之胁痛;炙甘草甘以缓急,合生姜共奏有益气补中之效;薄荷少许,助泻肝郁之热^[4-5]。而目前由于现代中青年工作压力较大,以及老龄化人口的日益增加,普遍存在肝郁气滞、脾虚血虚的情况,因此大众对于服用逍遥丸,疏肝健脾,养血和血

的需求较大^[6-8];因此,薄荷作为逍遥丸中重要的药材之一,控制好逍遥丸的质量,预防在逍遥丸制作完成之前的基础药材存在掺伪的情况,尤其关键。薄荷和留兰香属于同科同属的植物,两者均属于唇形科植物,性状相近,因此无法在显微镜下鉴别^[9];然而两者的主要成分和主治功效却大相径庭,薄荷主要成分是薄荷脑,主要功效为疏肝行气,泻肝郁之热^[10];而留兰香的主要成分是香芹酮,主要功效为解表和中^[11]。目前薄荷药材的检查项中没有香芹酮的检查项,比较不容易发现药材本身是否存在掺伪的问题,故本研究采集3个不同厂家各2个不同批次的逍遥丸进行检验,以薄荷脑和香芹酮为对照品,旨在采用指纹图谱分析逍遥丸的同时,建立其掺伪检验方法。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 气相色谱仪(型号:7890 A, AGILENT 安捷伦科技有限公司);全自动智能内校分析天平(型号:PTY124,福州普力斯特科学仪器有限公司)。

1.2 试剂 由中国食品药品检定研究院提供的批号为 0728-200005 薄荷脑;由德国 Dr. Ehrenstorfer GmbH 研究所提供的批号为 00610 的香芹酮;以及分析纯购于 Fisher scientific 公司。

1.3 分析样品 取3个不同厂家(A厂家:仲景宛西制药股份有限公司;批准文号:国药准字 Z41021831;B厂家:九芝堂股份有限公司;批准文号:国药准字 Z43020469;C厂家:兰州佛慈制药股份有限公司;批准文号:国药准字 Z62020890)的逍遥丸,每个厂家各取2批不同生产批次的逍遥丸用研磨器研细,精密取2g逍遥丸粉末。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

为进行掺伪检验方法建立,采用2种色谱方法进行检测,具体如下。

2.1.1 气相色谱与质谱联用法(GC-MS法) 采用质谱检测器,EI源,同时选用5%二苯基95%二甲基聚硅氧烷固定液(HP-5MS)毛细管柱(30 m × 0.25 mm × 0.25 μm),毛细管柱的进样口温度为200℃;柱温为程序升温,具体升温程序为初始温度90℃,以3℃/min升温至246℃,以30℃/min升温至280℃,保持5min,最后以FID检测器温度为300℃,全扫描方式,m/z 20~1000,柱流量1 mL/min,进样量1 μL,不分流。

2.1.2 气相色谱法(GC) 采用DM-5(5%二苯基95%二甲基聚硅氧烷固定液)毛细管柱(30 m × 0.53 mm × 1.5 μm),其进样口温度200℃,程序升温(同2.1.1),柱流量3 mL/min,进样量1 μL,不分流。

2.2 对照品溶液的制备 精密称取薄荷脑和香芹酮对照品,分别加分析纯(乙酸乙酯)制成每毫升含50 μg的对照溶液。

2.3 供试品溶液的制备 精密称取逍遥丸粉末0.5g,加入200 mL水的挥发油测定容器中,充分摇匀,待粉末完全溶于水后加入2 mL分析纯(乙酸乙酯),参照《中华人民共和国药典2010版一部附录XD》^[12]中挥发油测定的方法使挥发油测定容器保持微沸状态2h,取乙酸乙酯层作为供试品溶液。

2.4 专属性试验 取同一供试品溶液根据2.3制备的供试品溶液各5 μL,采用薄层层析方法(TLC)对逍遥丸进行专属性试验,分别点与同一片硅胶G

薄层色谱板,展开剂的配比为19环乙烷:1乙酸乙酯,经过展开后,取出硅胶G薄层色谱板并晾干,随即将含有2%对二甲氨基苯甲醛的40%硫酸溶液喷在色谱板上,加热100℃,5min后将色谱板放置于365nm的紫外光灯下观察,专属性试验结果显示逍遥丸的专属性良好。

2.5 线性关系考察 精密量取混合对照品溶液3、6、12、18、24 mL,分别置50 mL量瓶中,记录峰面积;以混合对照品进样量(μg)为横坐标(X,峰面积积分为纵坐标(Y),绘制标准曲线,结果表明,薄荷和香芹酮混合对照品溶液在0.060 21~0.113 48 μg范围内线性关系良好。

2.6 中间精密度试验 精密吸取10 μL同一供试品溶液,连续进样5次,结果显示相对标注偏差RSD是0.91%,精密度良好。

2.7 供试品溶液稳定性试验 精密吸取10 μL同一供试品溶液,配置后分别放置0、2、4、8、16、24、48 h后进样检测,结果显示48 h内供试品溶液基本稳定,RSD是0.94%。

2.8 重复性试验 精密吸取10 μL同一供试品溶液,在相同色谱条件,相同分析仪上检测5次,结果显示标准偏差RSD为0.90%,重复性良好。

2.9 回收率试验 采用加样回收法,精密称取6份已知含量的同一批号样品各约0.5g,分别精密加入20 mL混合对照品溶液,进行回收率试验测定,计算结果显示平均回收率为99.35%,RSD为0.86%。

2.10 样品测定结果

2.10.1 GC色谱图 如图1显示A厂逍遥丸供试品中未检出香芹酮,而B、C厂均检测出含有香芹酮,且C厂香芹酮PA值高于B厂。

2.10.2 逍遥丸GC-MS色谱图 根据GC-MS色谱图,采用正离子方式扫描,结果显示,薄荷脑和香芹酮的GC-MS特征离子峰分别是m/z 41、55、71、81、95和m/z 39、54、82、93、108。见图2。

表1 逍遥丸中薄荷脑和香芹酮含量测定(mg/g)

批次	薄荷脑	香芹酮
A厂家001	1.205	0
A厂家002	1.316	0
B厂家003	0.639	1.639
B厂家004	0.547	2.894
C厂家005	0.998	5.423
C厂家006	1.031	7.022

3 讨论

3.1 掺伪方法建立的必要性 市场上售卖的薄荷

药材处理方式都是揉碎薄荷叶子,因此单纯从药材性状上很难和同科同属的留兰香进行显微鉴别^[13],根据薄荷和留兰香的主要成分不同,薄荷主要成分为薄荷脑,并不含有香芹酮^[14],因此本研究首先通过薄层层析法(TLC)对薄荷脑和香芹酮进行专属性试验,进行直接鉴别。当通过 TLC 明确薄荷脑和香芹酮的专属性后,根据《中华人民共和国药典》附录规定薄荷和留兰香属于同科同属植物,在种植的时候容易混入,因此允许的杂质最高限度是 5%^[15],研究进一步采用 GC 法对逍遥丸中薄荷脑和香芹酮进行成分指纹图谱分析,结果显示 A 厂未检测出香芹酮,而 B、C 厂均检测出程度不等的香芹酮含量。为了进一步确证,研究采用 GC-MS 法进步对逍遥丸进行指纹图谱分析,在 GC-MS 质谱图中,与对照品色谱比较,供试品色谱图不可以出现保留时间相同的色谱峰;若出现保留时间相同的色谱峰,则其一级质

谱不得与对照品的一级质谱一致^[16-18]。

3.2 展开剂和显色剂的选择 在专属性试验 TLC 法中展开剂和显色剂的选择尤为重要,其中展开剂的选择能够更好的让目标成分更好的与周围的干扰斑点分开^[19],在本研究的前期试验中曾采用甲苯-乙酸乙酯(19:1)、环己烷-乙酸乙酯(10:1)、环己烷-乙酸乙酯(10:2)、环己烷-乙酸乙酯(19:1)为展开剂,结果选用环己烷-乙酸乙酯(19:1)色谱效果最理想,香芹酮与周围干扰的斑点可以分开。

而由于薄荷和留兰香是同科同属植物,薄荷药材中与香芹酮 Rf 值相近的位置斑点颜色与香芹酮类似,可能会引起误判,研究前期试验中曾使用 5% 香草醛硫酸溶液作为显色剂^[20],置荧光下检视,未能将香芹酮斑点与周围干扰斑点明确区分开,而采用 2% 对二甲氨基苯甲醛作为显色剂时香芹酮斑点颜色与周围斑点颜色明显有区别。

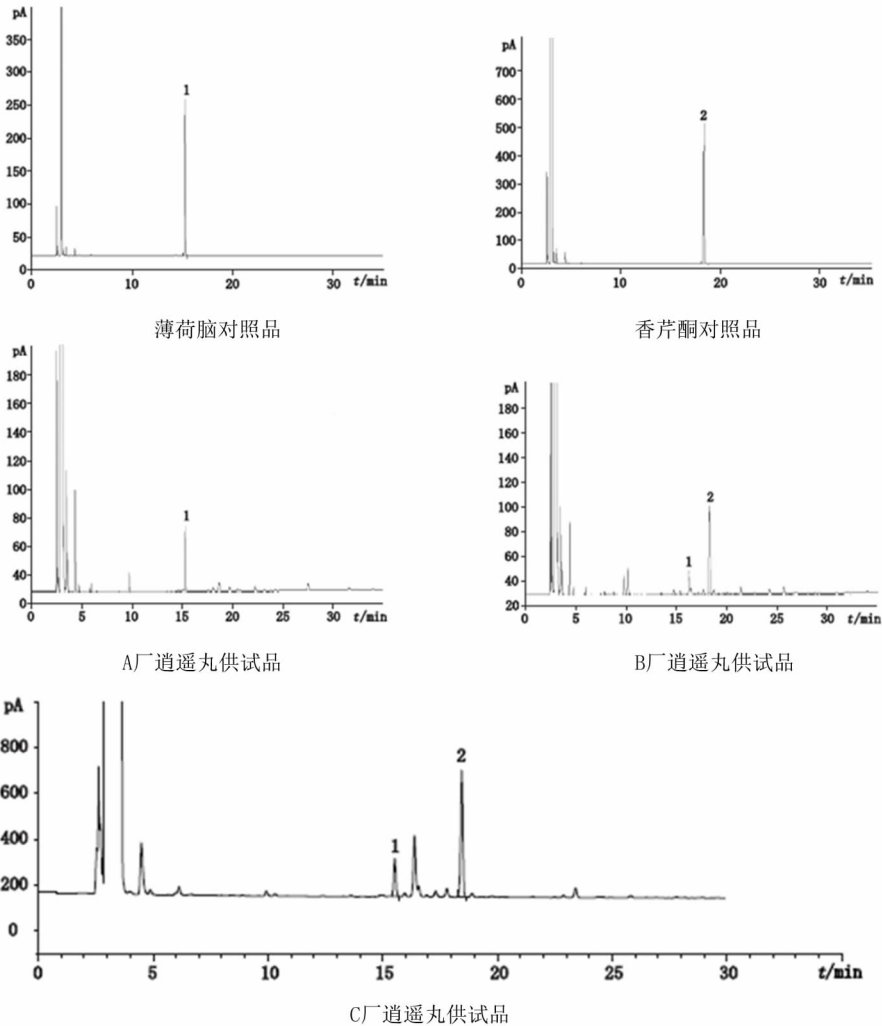
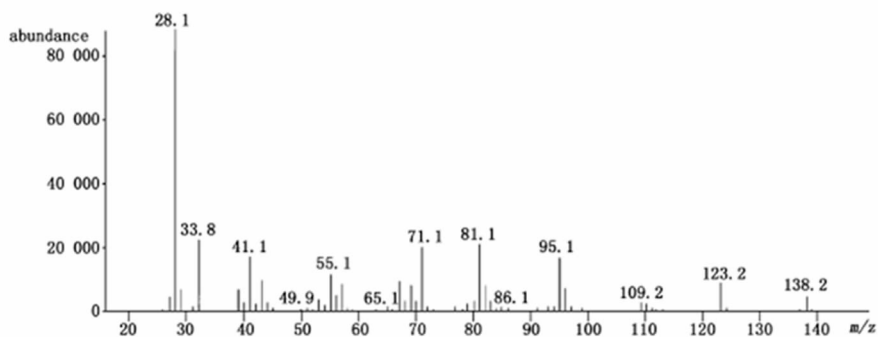
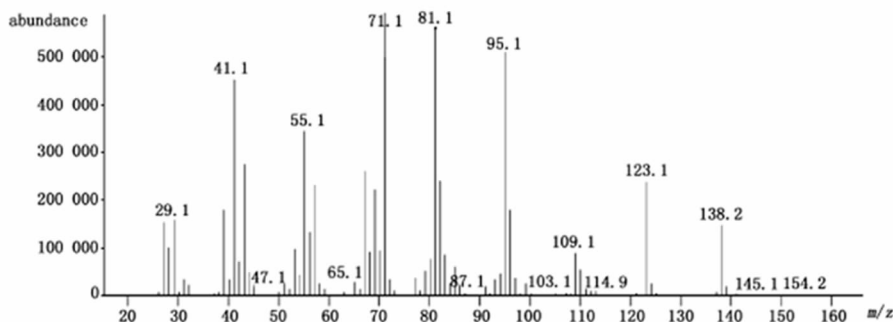


图1 逍遥丸 GC 色谱图

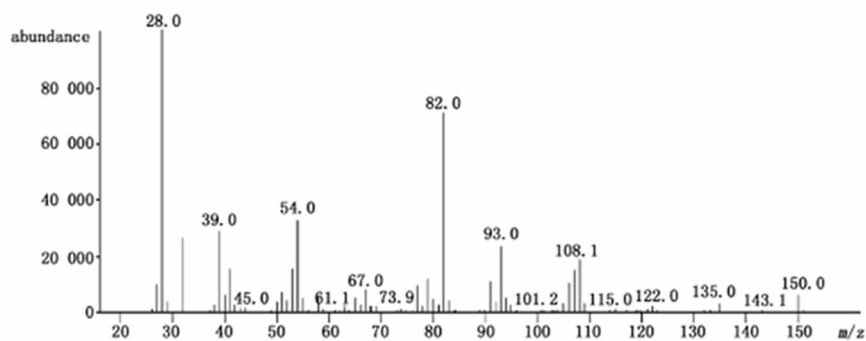
注:1 为薄荷脑;2 为香芹酮



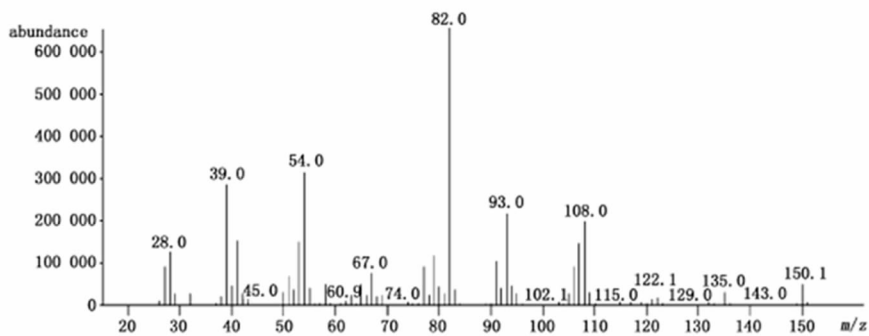
逍遥丸中的薄荷脑



薄荷脑对照品



逍遥丸中的香芹酮



香芹酮对照品

图2 逍遥丸 GC-MS 色谱图

3.3 毛细管柱的选择 采用气相色谱仪分析逍遥丸指纹图谱中 GC 法和 GC-MS 法中毛细管柱的选择尤其重要,其耐用性决定后续中精密性、稳定性、重复性和结果可靠性的关键因素^[21-23],在 GC 法中选择 DM-5 (5% 二苯基-95% 二甲基聚硅氧烷固定

液)毛细管柱和在 GC-MS 法中选择 HP-5MS (5% 二苯基-95% 二甲基聚硅氧烷固定液)毛细管柱,2 种毛细管柱均具有良好的分离度和塔板数,表明本研究中逍遥丸指纹图谱选用的毛细管柱耐用性良好。

3.4 方法严谨性考察意义 指纹图谱中线性考察

的意义在于分析样品在某一个浓度或峰高(面积)情况是否是成线性的,根据朗伯比尔定律,待测样品面积与浓度在这个线性范围内成正比,分析结果才是准确的^[24]。而加样回收率包括绝对回收率和相对回收率,其中相对回收率有一种是回收试验法,另一种是加样回收试验法^[25]。而本研究的目的是为了考察指纹图谱检测方法的严谨性,因此需要分析相对回收率,故而选用加样回收试验法,即在已知浓度样品中加入药物,并与标准曲线作比较。

参考文献

- [1]李慧,白红彤,王晓,等. 椒样薄荷、薄荷和苏格兰留兰香精油与抗生素的协同抑菌功能[J]. 植物学报,2011,46(1):37-43.
- [2]于清跃,朱新宝. 薄荷种植与薄荷精油提取研究进展[J]. 安徽农业科学,2012,40(13):7911-7913.
- [3]曹继华,朱聪明,李艳丽. 薄荷及其伪品的鉴别[J]. 河南中医学报,2004,19(1):30-31.
- [4]邢艳红. 论逍遥丸加减临床应用的新功效[J]. 中国现代药物应用,2015,9(4):206-207.
- [5]李梦涛,项辉. 逍遥丸(散)有效成分及药理作用研究进展[J]. 中药材,2010,33(12):1968-1972.
- [6]张大文,童容容,黄月花,等. 逍遥丸合六味地黄丸治疗男性更年期抑郁症48例[J]. 中国中医药现代远程教育,2014,12(17):50-51.
- [7]武秦. 逍遥丸治疗更年期综合征举隅[J]. 陕西中医学院学报,2015,38(4):95-96.
- [8]郑希林,张静. 逍遥丸在妇科疾病中的应用[J]. 开卷有益(求医问药),2011,11(12):30-31.
- [9]曹亮,秦双双,袁媛,等. 薄荷、留兰香特异性引物 PCR 鉴别方法研究[J]. 中药材,2014,37(1):41-45.
- [10]梁呈元,李维林,张涵庆,等. 薄荷化学成分及其药理作用研究进展[J]. 中国野生植物资源,2003,22(3):9-12.
- [11]郑健,高慧媛,陈广通,等. 留兰香的活性成分(I)[J]. 沈阳药

科大学学报,2006,23(3):145-147.

- [12]张海燕,郭伟魁,宋民宪,等. 《中华人民共和国药典》2010年版药用辅料标准探讨[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(11):289-291.
- [13]甄汉深,张三平,徐世霞,等. 上海市郊栽培薄荷的初步鉴定和分析[J]. 中草药,2001,32(4):360-361.
- [14]崔宇宏,高天爱,安志强. 薄荷及其伪品留兰香的鉴别[J]. 光明中医,2011,26(8):1712-1714.
- [15]张涛. 薄荷药材鉴别方法的改进及其质量分析[J]. 中国药物与临床,2013,13(8):1056-1057.
- [16]赵鸣舒,刘文京,赵希贤,等. 静态顶空气相色谱法快速鉴别薄荷[J]. 首都医药,2010,10(20):49-50.
- [17]吕乔璐,武维,迟森森,等. HS/SPME-GC-MS 法分析不同采收期薄荷药材挥发油成分动态变化[J]. 北京中医药大学学报,2017,40(2):155-158.
- [18]颜永刚,郭晓恒,邓翀. 云南产野生和栽培薄荷中挥发油的 GC-MS 比较分析[J]. 中草药,2011,42(6):1090-1092.
- [19]于倩,任海娇,张秋,等. 薄层板对薄层色谱法测定枸杞子中甜菜碱的影响[J]. 中国医药指南,2013,11(23):461-462.
- [20]许英爱,金瑛. 薄层扫描法测定逍遥丸中阿魏酸的含量[J]. 药学实践杂志,2001,19(3):166-167.
- [21]姜娜,冯丽君,孙茂,等. 毛细管柱气相色谱法测定养阴清肺糖浆中薄荷脑的含量[J]. 中国药师,2013,16(6):849-852.
- [22]万丽,周立,胡轶娟,等. 气相色谱法测定麝香舒活精中樟脑、薄荷脑、冰片含量[J]. 成都中医药大学学报,2007,30(4):50-52.
- [23]张水龙,王红梅,叶基荣. 气相色谱法测定虎标万金油中薄荷脑及樟脑的含量[J]. 中国药品标准,2003,4(2):44-46.
- [24]刘琨. GC 法测定薄荷中薄荷脑的含量[J]. 黑龙江科技信息,2015,21(32):105.
- [25]朱邵晴,朱振华,郭盛,等. 不同干燥方法对薄荷药材中多元功效成分的影响与评价[J]. 中国中药杂志,2015,40(24):4860-4867.

(2018-01-30 收稿 责任编辑:杨觉雄)