

跌打活血散气相色谱指纹图谱

何风艳, 何轶*, 胡晓茹, 戴忠, 马双成
(中国食品药品检定研究院, 北京 100050)

[摘要] **目的:**建立跌打活血散气相色谱指纹图谱,为制剂的质量评价提供参考。**方法:**建立制剂 GC 指纹图谱,使用中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2008 版)计算相似度;采用 GC-MS 法,通过对照品比对,NIST 谱库及文献检索对共有峰进行指认,并与对照药材比对确定其来源。**结果:**方法学考察显示建立的 GC 指纹图谱精密度、重复性、稳定性均可满足指纹图谱分析的需要;指纹图谱中呈现 20 个共有峰,对其中的 17 个进行了指认;14 批样品的指纹图谱相似度评价结果在 0.564 ~ 0.986,表明不同样品的质量差异较大。**结论:**建立的 GC 指纹图谱方法快速、简便,能够全面反映跌打活血散中化学成分信息,可用于跌打活血散质量评价。

[关键词] 跌打活血散; 气相色谱; 指纹图谱; 相似度

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)02-0053-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017020053

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20160919.1359.064.html>

[网络出版时间] 2016-09-19 13:59

GC Fingerprint Analysis of Dieda Huoxue Powder

HE Feng-yan, HE Yi*, HU Xiao-ru, DAI Zhong, MA Shuang-cheng
(National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a GC chromatographic fingerprint analysis method for the quality evaluation of Dieda Huoxue powder. **Method:** The fingerprint chromatography was performed by GC. The similarity was evaluated with Similarity Evaluation System for Chromatographic Fingerprint of Traditional Chinese Medicine (version 2008). Common peaks were identified by GC-MS through the comparison with the references, literature, and/or NIST database. Meanwhile, their origins were determined through the comparison with reference drugs. **Result:** The precision, repeatability and stability of the established method can meet the requirements of fingerprint chromatography analysis. There were 20 common peaks in the GC fingerprint, among which 17 peaks were identified. The similarity of 14 batches of samples ranged from 0.564 to 0.986, indicating greater differences in the qualities among the samples. **Conclusion:** The developed method could provide the comprehensive information about the chemical components in Dieda Huoxue powder in a rapid and convenient manner. It could be used in quality evaluation of the drug.

[Key words] Dieda Huoxue powder; GC; fingerprint; similarity

跌打活血散是由红花、当归、血竭等 12 味药材的原粉组成,具有疏经活血、散瘀止痛的功效,临床用于跌打损伤,瘀血疼痛,闪腰岔气^[1]。本方为临床经验方,自 1977 年起收载于历版《中国药典》,目

前执行 2015 年版《中国药典》一部标准,其中仅收载了大黄、儿茶等药味的薄层鉴别,亟待提高。指纹图谱是建立在中药化学成分系统研究的基础上,对中药多组分复杂体系进行评价的有效手段,已被深

[收稿日期] 20160104(007)

[第一作者] 何风艳, 硕士, 助理研究员, 从事中药分析研究, Tel: 010-67095282, E-mail: hfy_198616@163.com

[通讯作者] * 何轶, 博士, 副研究员, 从事中药质量控制研究, Tel: 010-67095150, E-mail: zjsheyi@sina.com

入研究并收录于 2015 年版《中国药典》。目前跌打活血散的质量研究多集中在阿魏酸, 羟基红花黄色素 A, 儿茶素等^[2-4]成分的鉴别及含量测定, 对于该制剂的指纹图谱研究未见报道。回顾该制剂处方组成, 含挥发性成分的药味可达到处方总量的 30%, 但并无针对此类成分的质控研究。本实验采用气相色谱法建立跌打活血散的指纹图谱, 以期在整体上反映出相关成分在成药中的状况、相关药味的投料情况以及不同企业产品之间的差异, 为客观、全面地评价药品质量提供有力的参考依据。

1 材料

7890B 型气相色谱仪, 7000C 型气相色谱-质谱联用仪(配有 NIST 谱库 2.0 版本, 美国 Agilent), AE240 型电子天平(瑞士 Mettler), KQ-300DA 型医用数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

对照品龙脑(批号 110881-201508), 异龙脑(批号 111512-200802), α -蒎烯(批号 110897-200502), 乙酸辛酯(批号 111671-201403), 对照药材冰片(批号 110743-200905), 血竭(批号 120906-200609), 乳香(批号 120970-200904), 胶质没药(批号 121250-200503), 天然没药(批号 120967-201104), 红花(批号 120907-201111), 儿茶(批号 121397-200401), 当归(批号 120927-201014), 土鳖虫(批号 121489-200602), 骨碎补(批号 121169-200503), 续断(批号 121033-201110), 大黄(批号 120902-201311), 三七(批号 120941-201108)均由中国食品药品检定研究院提供。乙酸乙酯为分析纯。跌打活血散共计 14 批, 来自 7 家企业, 均为市售样品。来源见表 1。

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 对照品溶液 精密称取龙脑、异龙脑、乙酸辛酯、 α -蒎烯对照品适量, 加乙酸乙酯分别制成每 1 mL 含 0.5, 0.3, 0.3, 0.5 mg 的溶液, 即得。

2.1.2 供试品溶液 取跌打活血散 1.5 g, 精密称定, 置 50 mL 锥形瓶中, 精密加入乙酸乙酯 10 mL, 称定质量, 冰浴超声提取(功率 300 W, 频率 40 kHz) 20 min, 取出, 放置至室温, 用乙酸乙酯补足缺失的质量, 摇匀, 用 0.45 μ m 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

2.1.3 对照药材溶液 分别取单味对照药材, 按照处方折算出 1.5 g 跌打活血散中所含的量, 精密称定, 按 2.1.2 项下方法制备, 即得。

2.2 GC-FID 测定条件 采用 HP-5 ms 毛细管柱(0.25 mm \times 30 m, 0.25 μ m), 载气氮气, 分流进样,

表 1 跌打活血散来源信息

Table 1 Information of Dieda Huoxue powder

厂家	批号	编号
A	16141002	S1
	16141001	S2
	16140701	S3
	16140703	S4
	16140702	S5
B	140201	S6
C	20150101	S7
	20140401	S8
D	150201	S9
	140901	S10
E	150401	S11
F	20150101	S12
G	20130401	S13
	20140201	S14

分流比 5:1, 程序升温, 初始温度 50 $^{\circ}$ C, 5 $^{\circ}$ C \cdot min⁻¹ 升至 150 $^{\circ}$ C, 20 $^{\circ}$ C \cdot min⁻¹ 升至 210 $^{\circ}$ C, 5 $^{\circ}$ C \cdot min⁻¹ 升至 270 $^{\circ}$ C, 保持 10 min, 进样口温度 220 $^{\circ}$ C, FID 检测器温度 280 $^{\circ}$ C, 进样量 1 μ L。

2.3 GC-MS 分析条件 色谱条件: 载气氦气, 分流进样, 分流比 10:1, 其余同 2.2 项下。

质谱条件: 电子轰击离子源(EI), 电子能量 70 eV, 离子源温度 230 $^{\circ}$ C, 数据采集扫描方式全扫描, 质量范围 m/z 50 ~ 1 050。

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度的试验 取同一供试品溶液, 在上述色谱条件下连续进样 6 次, 分别记录色谱峰的保留时间和峰面积, 以龙脑峰为参照, 计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积, 结果相对保留时间的 RSD < 0.06%, 相对峰面积的 RSD < 2.6%, 表明仪器精密度的良好。

2.4.2 重复性的试验 取同一批次样品, 按 2.1.2 项下方法制备供试品溶液 6 份, 在上述色谱条件下进样, 分别记录色谱峰的保留时间和峰面积, 以龙脑峰为参照, 计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积, 结果相对保留时间的 RSD < 0.06%, 相对峰面积的 RSD < 3.0%, 表明方法重复性良好。

2.4.3 稳定性的试验 取同一供试品溶液, 在上述色谱条件下, 分别在 0, 2, 4, 8, 12, 18 h 进样, 分别记录色谱峰的保留时间和峰面积, 以龙脑峰为参照, 计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积, 结果相对保留时间的 RSD < 0.05%, 相对峰面积的 RSD < 3.3%, 表明样品在 18 h 内稳定。

2.5 指纹图谱的建立及相似度分析 分别取 7 个厂家的 14 批样品,按 2.1.2 项下方法制备供试品溶液,按 2.2 项下色谱条件进行测定,得到 14 个样品的 GC 指纹图谱。运用国家药典委员会“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2008 版)对 14 批样品的指纹图谱进行分析,确定 20 个共有峰(编号 1~20),建立跌打活血散指纹图谱,结果见图 1,其中 R 为共有模式的对照图谱,14 批样品相似度分别为 0.963,0.966,0.930,0.907,0.909,0.832,0.811,

0.810,0.580,0.564,0.801,0.986,0.985,0.989。

2.6 共有峰的指认及药味归属分析 取对照品溶液、对照药材溶液及供试品溶液,采用 GC 法,GC-MS 法,通过保留时间、质谱数据比对确定 20 个共有峰的药味来源,见图 2,结合 NIST 谱库检索及文献检索,对其中 17 个共有峰进行指认,结果见表 2。

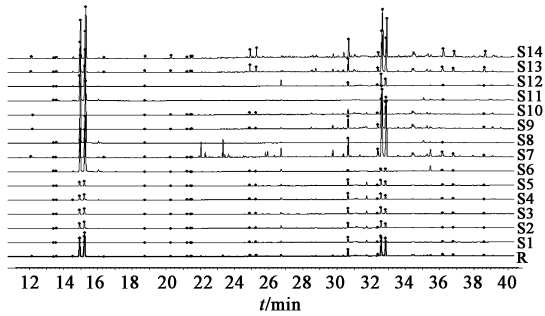
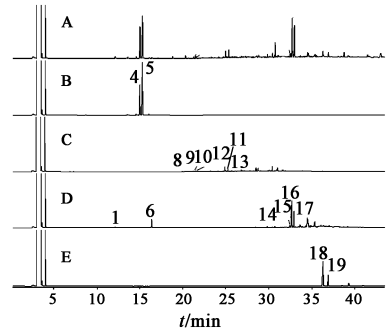


图 1 跌打活血散 GC 指纹谱

Fig. 1 GC fingerprint of Dieda Huoxue powder



A. 跌打活血散;B. 冰片;C. 乳香;D. 没药;E. 血竭

图 2 跌打活血散及对照药材 GC

Fig. 2 GC chromatograms of Dieda Huoxue powder and reference drugs

表 2 共有峰指认及药味归属

Table 2 Identification and origin assignment of characteristic peaks in GC fingerprint

No.	t/min	化合物	母离子/m/z	碎片离子/m/z	指认方式	药味归属
1	12.11	1-辛醇	130(0.05)	84(71),69(79),56(100)	NIST,文献[5]	乳香
2	13.43	异小茴香醇	172(0.03)	112(28),84(84),70(100),61(61),56(80)	NIST	冰片
3	13.58	(+)-葑醇	154(0.3)	111(16),81(100),69(21)	NIST	冰片
4	14.99	异龙脑	154(0.7)	110(25),95(100),67(10)	NIST,对照品	冰片
5	15.30	龙脑	154(1.6)	110(63),95(100),139(22),67(15)	NIST,对照品	冰片
6	16.37	1-辛醇乙酸酯	172(0.03)	112(28),84(84),70(100),61(61),56(80)	NIST,对照品,文献[5-6]	乳香
7	18.77	龙脑乙酸酯	196(0.5)	154(12),136(48),121(12),95(100),93(46)	NIST,文献[5-6]	乳香
8	20.28	δ -榄香烯	204(4.7)	161(41),93(70),	文献[7-9]	没药
9	21.23	α -可巴烯	204(22)	161(100),119(90),105(83),93(38)	文献[8,10]	没药
10	21.45	β -波旁烯	204(2)	161(41),123(78),81(100)	文献[7,9-10]	没药
11	21.53	β -榄香烯	204(4)	107(66),93(100),81(92)	文献[7-11]	没药
12	24.92	莜术呔喃二烯酮	230(43)	122(100),94(34)	文献[9-10,12-17]	没药
14	30.68	verticiol	290(0)	257(100),189(30)	NIST,文献[5-6]	乳香
16	32.65	因香酚	306(72)	156(65),125(100),71(64)	文献[18-19]	乳香
17	32.90	因香酚乙酸酯	348(38)	150(56),125(55),71(100)	文献[19]	乳香
18	36.23	(2S)-5-甲氧基黄烷-7-醇	256(100)	152(81),124(20),117(32)	文献[20-22]	血竭
19	36.86	(2S)-5-甲氧基-6-甲基黄烷-7-醇	270(100)	239(20),166(69),138(22),91(15)	文献[20-22]	血竭

3 讨论

相较于 HPLC-MS 方法,GC-MS 法重复性好,化合物的裂解图谱再现性高,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合物定性分析的有效方法。本实验采用 NIST 谱库对小分子挥发性成分进行指认,其谱图的相似度均 >90%,结果可信。

的 GC 指纹图谱主要体现了冰片、没药、乳香、血竭 4 味药材的成分,而且多为活性成分。例如,冰片中的龙脑具有抗炎、镇痛、细胞和 DNA 修复等活性^[23],没药中的 β -榄香烯、莜术呔喃二烯酮均具有抗肿瘤活性,乳香中的因香酚和因香酚乙酸酯具有良好的肿瘤抑制活性及抗炎活性^[24-25]。通过在指纹图谱中控制上述成分,可有效地评价该药品的质量。

根据药味归属及共有峰指认结果,跌打活血散

在《中国药典》中乳香和没药均有多种来源。

其中乳香有索马里乳香和埃塞俄比亚乳香等不同来源。没药也可分为胶质没药与天然没药,两者 GC 指纹图谱差异较大。测定的 14 批样品中,所有样品均使用埃塞俄比亚乳香投料;没药则主要使用天然没药投料,仅有 1 批样品采用胶质没药投料,这也是导致该批样品相似度结果较低的原因之一。

全部 7 个厂家的 14 批样品的指纹图谱相似度评价结果介于 0.564 ~ 0.989,同一厂家的结果较为接近,不同厂家之间结果差异较大。除乳香没药等药味存在不同基源,影响相似度结果外,本研究还发现存在冰片、乳香、没药、血竭 4 味药对应的色谱峰面积小甚至缺失的情况。对于冰片和没药中的挥发性成分,有可能在制剂生产和贮存过程中挥发损失,从而影响指纹图谱的相似度计算结果。但是对于乳香和血竭等药味,指纹图谱中控制的色谱峰主要为因香酚和(2S)-5-甲氧基黄烷-7-醇等非挥发性成分。这些成分色谱峰的减少或缺失,最有可能是由于原料药的质量问题、少投料或不投料等问题所导致。今后应加强对生产企业的原料质量控制以及生产过程的监督管理。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:1590.

[2] 刘刚,谭生建,王海涛,等. 高效液相色谱法测定跌打活血散中儿茶素和表儿茶素的含量[J]. 中国药学杂志, 2011, 46(18): 1444-1446.

[3] 王戈,李中娥. HPLC 法测定跌打活血散中羟基红花黄色素 A 的含量[J]. 中国药师, 2012, 15(12): 1737-1738.

[4] 厉姐,张静,康廷国. RPHPLC 波长切换法同时测定跌打活血散中羟基红花黄色素 A 和阿魏酸含量[J]. 辽宁中医药大学学报, 2015, 17(5): 62-64.

[5] 刘洪玲. 乳香挥发油化学成分的气相色谱-质谱分析[J]. 时珍国医国药, 2009, 20(2): 370-371.

[6] 夏华玲,赵新杰. 乳香挥发油化学成分的 GC-MS 分析[J]. 中草药, 2003, 34(2): 119.

[7] Semnani K M, Saeedi M. Constituents of the essential oil of *Commiphora myrrha* (Nees) Engl var. *molmol*[J]. J Essent Oil Res, 2003, 15(1): 50-51.

[8] EL-Kamali H H, Burham B O, EL-Egami A A B. Determination of volatile compounds from *Commiphora myrrha* (Nees) Engl. resin marketed in central sudan by GC/MS[J]. Am J Bio Sci, 2015, 3(4): 117-120.

[9] Ali A. Repellent, antifeedant & molluscicidal effects of commiphoraspp. Oleoresins, and their extracts, on deroceras reticulatumand Helix aspersa [D]. Cardiff: Cardiff University, 2005.

[10] Hanuš L O, Rosenthal D, Režanka T, et al. Fast and

easy GC/MS identification of myrrh resins[J]. Pharm Chem J, 2008, 42(12): 719-720.

[11] Aspollah S M, Wah T S, Saad S M, et al. Bioactive sesquiterpenes from *Curcuma ochrorhiza* and *Curcuma heyneana*[J]. Nat Prod Res, 2010, 24(9): 838-845.

[12] Brieskorn C H, Noble P. Furanosquiterpenes from the essential oil of myrrh[J]. Phytochemistry, 1983, 22(5): 1207-1211.

[13] Maradufu A. Furanosquiterpenoids of *Commiphora erythraea* and *C. myrrh*[J]. Phytochemistry, 1982, 21(3): 677-680.

[14] Brieskorn C H, Noble P. Constituents of the essential oil of myrrh II: sesquiterpenes and furanosesquiterpenes [J]. Planta Medica, 1982, 44: 87-90.

[15] ZHU N, Kikuzaki H, SHENG S, et al. Furanosesquiterpenoids of *Commiphora myrrha* [J]. J Nat Prod, 2001, 64(11): 1460-1462.

[16] Sukari M A, Wah T S, Saad S M, et al. Bioactive sesquiterpenes from *Curcuma ochrorhiza* and *Curcuma heyneana* [J]. Nat Prod Res, 2010, 24(9): 838-845.

[17] YANG F Q, LI S P, ZHAO J, et al. Optimization of GC-MS conditions based on resolution and stability of analytes for simultaneous determination of nine sesquiterpenoids in three species of *Curcuma* rhizomes [J]. J Pharm Bio Anal, 2007, 43(1): 73-82.

[18] Niebler J, Buettner A. Identification of odorants in frankincense (*Boswellia sacra* Flueck.) by aroma extract dilution analysis and two-dimensional gas chromatography-mass spectrometry/olfactometry [J]. Phytochemistry, 2015, 109: 66-75.

[19] Hamm S, Bleton J, Connan J, et al. A chemical investigation by headspace SPME and GC-MS of volatile and semi-volatile terpenes in various olibanum samples [J]. Phytochemistry, 2015, 66(12): 1499-1514.

[20] 蔡授印. 排钱树与血竭化学成分之研究 [D]. 桃园: 中原大学, 1994.

[21] Gupta D, Bleakley B, Gupta R K. Dragon's blood: Botany, chemistry and therapeutic uses [J]. J Ethnopharmacol, 2008, 115(3): 361-380.

[22] Shen C C, Tsai S Y, Wei S L, et al. Flavonoids isolated from *Draconis resina*[J]. Nat Prod Res, 2007, 21(4): 377-380.

[23] 熊振宇,肖复明,徐旭,等. 植物药用成分龙脑的药学活性研究 [J]. 中国中药杂志, 2013, 38(6): 786-790.

[24] 赵金凤,周春兰,韩陆,等. 没药研究进展[J]. 中国药房, 2011, 22(7): 661-665.

[25] 王峰,李占林,刘涛,等. 乳香中西松烷型二萜类化合物[J]. 中国中药杂志, 2009, 34(19): 2477-2480.

[责任编辑 顾雪竹]