

气相色谱法同时测定夜寒苏药材挥发油中 α -蒎烯、 β -蒎烯及芳樟醇的含量^Δ

张彪^{1*}, 黄芳², 周汉华^{1#}, 张浪¹, 董明洪¹, 于泽玥¹, 张蜜¹(1.贵阳中医学院药学院, 贵阳 550025; 2.铜仁职业技术学院药学院, 贵州铜仁 554300)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)07-0933-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.07.17

摘要 目的:建立同时测定夜寒苏药材挥发油中 α -蒎烯、 β -蒎烯及芳樟醇含量的方法。方法:按照2015年版《中国药典》(四部)水蒸气蒸馏法进行夜寒苏挥发油的提取。采用气相色谱法测定含量,采用HP-5毛细管色谱柱(30 m×0.032 mm×0.25 μ m),氢火焰离子化检测器(FID),载气为氮气,进样口温度为200 $^{\circ}$ C,检测器温度为250 $^{\circ}$ C,柱流量为0.8 mL/min,进样量为1 μ L,分流比为40:1,程序升温。结果: α -蒎烯、 β -蒎烯及芳樟醇的线性范围分别为0.090 5~2.413 3 mg/mL($r=0.999 9$)、0.098 3~2.620 0 mg/mL($r=0.999 9$)、0.169 1~4.510 0 mg/mL($r=0.999 8$),精密性、稳定性(12 h)、重复性试验的RSD $\leq 2.0\%$ ($n=6$),平均加样回收率分别为99.84%(RSD=0.49%, $n=6$)、100.24%(RSD=1.38%, $n=6$)、99.41%(RSD=1.67%, $n=6$)。23批黔产夜寒苏样品挥发油中 α -蒎烯、 β -蒎烯及芳樟醇含量分别在0.214 4~1.325 0、0.766 2~3.172 1、0.357 4~1.518 7 mg/g范围内。结论:本试验建立的方法快速、简便、准确,可用于夜寒苏药材挥发油中 α -蒎烯、 β -蒎烯及芳樟醇含量的测定。

关键词 夜寒苏;挥发油; α -蒎烯; β -蒎烯;芳樟醇;气相色谱法

Simultaneous Determination of α -pinene, β -pinene and Linalool in Volatile Oil from *Hedychium flavum* by GC

ZHANG Biao¹, HUANG Fang², ZHOU Hanhua¹, ZHANG Lang¹, DONG Minghong¹, YU Zeyue¹, ZHANG Mi¹ (1.College of Pharmacy, Guiyang University of TCM, Guiyang 550025, China; 2.School of Pharmacy, Tongren Polytechnic College, Guizhou Tongren 554300, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for simultaneous determination of α -pinene, β -pinene and linalool in volatile oil of *Hedychium flavum*. METHODS: The volatile oil was extracted from *H. flavum* according to steam distillation stated in *Chinese Pharmacopoeia* (2015 edition volume IV). GC method was adopted to determine the content. The determination was performed on HP-5 capillary chromatographic column(30 m×0.032 mm×0.25 μ m)with hydrogen flame ion detector (FID), nitrogen gas as carrier gas, with injector temperature of 200 $^{\circ}$ C, and detector temperature of 250 $^{\circ}$ C, column flow rate of 0.8 mL/min, samples size of 1 μ L and split ratio of 40:1 by programmed temperature. RESULTS: The linear range of α -pinene, β -pinene and linalool were 0.090 5-2.413 3 mg/mL($r=0.999 9$), 0.098 3-2.620 0 mg/mL ($r=0.999 9$), 0.169 1-4.510 0 mg/mL($r=0.999 8$), respectively. RSDs of precision, stability (12 h), reproducibility tests were no more than 2.0% ($n=6$). The average recoveries were 99.84% (RSD=0.49%, $n=6$), 100.24% (RSD=1.38%, $n=6$), 99.41% (RSD=1.67%, $n=6$), respectively. The contents of α -pinene, β -pinene and linalool ranged 0.214 4-1.325 0, 0.766 2-3.172 1, 0.357 4-1.518 7 mg/g in volatile oil from 23 batches of *H. flavum* produced in Guizhou province. CONCLUSIONS: The method established in this experiment is rapid, simple and accurate. It can be used for the content determination of α -pinene, β -pinene and linalool in volatile oil from *H. flavum*.

KEYWORDS *Hedychium flavum*; Volatile oil; α -pinene; β -pinene; Linalool; GC

夜寒苏为姜科植物黄姜花(*Hedychium flavum* Roxb.)的干燥块根,性温,味微甜,无毒,具有温中散寒、解表发汗、祛风除湿、补虚等功效^[1-4]。夜寒苏是贵州省苗族、布依族、侗族等同胞习用的药物。在20世纪70年代,《贵州草药》记载了夜寒苏在贵州民间常将该药用于治疗寒湿白带、体虚自汗、风湿筋骨疼痛、消化不良、感冒、胃气虚弱、头痛身痛、跌打损伤等病症^[5]。杨秀泽、周汉华等^[6-7]

虽然已对夜寒苏进行了性状及化学成分鉴别,但夜寒苏化学成分的研究报道目前相对仍然不足,其主要成分是挥发油。目前夜寒苏尚未被《中国药典》《地方标准》收载,没有明确的质量标准。鉴于此,笔者依据《贵州省中药材、民族药材质量标准》(2013年版)中规范和要求,采用气相色谱法同时测定夜寒苏药材挥发油中 α -蒎烯、 β -蒎烯及芳樟醇含量的方法。

1 材料

1.1 仪器

7890B 气相色谱仪,包括氢火焰离子化检测器(FID)、HP-5毛细管色谱柱(30 m×0.032 mm×0.25 μ m)、HP-5毛细管色谱柱(30 m×0.25 mm×0.25 μ m)、WM-

^Δ 基金项目:贵州省药监局基金(No.3040640150121)

* 药师,硕士研究生。研究方向:中药及民族药资源分类鉴定与质量控制。E-mail:893027168@qq.com

通信作者:教授。研究方向:中药鉴定学、中药资源学。E-mail:txty_008@163.com

PEG-20M 毛细管色谱柱(30 m×0.25 mm×0.032 μm)(美国 Agilent 公司);98-1-B 电热套(天津市泰斯特仪器有限公司);XS205 电子天平、AB204-S 分析天平(瑞士 Mettler-Toledo 公司);1 000 mL 挥发油提取器(天长市科仪实验设备有限公司);FW500A/1000A 高速多功能粉碎机(上海冰都电器有限公司)。

1.2 对照品与试剂

芳樟醇对照品(批号:111503-201603,纯度:97.8%)、 α -蒎烯对照品(批号:C16211000,纯度:98.5%)、 β -蒎烯对照品(批号:C16211020,纯度:99.5%)均购自中国食品药品检定研究院;正己烷为色谱纯。

1.3 药材

本试验所用23批夜寒苏药材均采集于贵州各地,经贵阳中医学院药学院中药鉴定教研室周汉华教授鉴定均为姜科姜花属植物黄姜花 *Hedychium flavum* Roxb. 的根茎,具体信息见表1。

表1 贵州产夜寒苏样品编号、产地、采集时间及采集人
Table 1 Sample number, place of origin, time of collection and collector of *H. flavum* produced in Guizhou province

编号	产地	采集时间	采集人
S1	遵义市	2016-08-12	张彪
S2	开阳县	2016-08-17	张彪
S3	凯里市	2016-08-22	周文杰
S4	孟关乡	2016-08-29	张彪
S5	织金县	2016-09-03	陈丽庄
S6	高坡乡	2016-09-13	张彪
S7	花溪区	2016-09-27	吴曦
S8	二戈寨	2016-10-01	张彪
S9	惠水县	2016-10-05	邓春华
S10	都匀市	2016-10-15	詹赞
S11	兴义市	2016-10-17	张彪
S12	正安县	2016-10-15	张浪
S13	乌当区	2017-08-13	张彪
S14	龙里县	2017-08-15	王江元
S15	余庆县	2017-08-23	黄佳俊
S16	普安县	2017-08-26	周文杰
S17	花溪区	2017-09-01	张彪
S18	修文县	2017-09-02	袁青青
S19	开阳县	2017-09-02	黄丹
S20	二戈寨	2017-09-12	张彪
S21	惠水县	2017-09-09	赵四钱
S22	黄平县	2017-09-16	周文杰
S23	高坡乡	2017-09-22	刘富贵

2 方法与结果

2.1 色谱条件

采用 HP-5 毛细管色谱柱(30 m×0.032 mm×0.25 μm),FID,载气为氮气(纯度:99.999%),进样口温度为 200 ℃,检测器温度为 250 ℃,柱流量为 0.8 mL/min,分流比为 40:1,进样量为 1 μL,程序升温(起始温度 60 ℃,保持 2 min;以 7 ℃/min 升温至 85 ℃,保持 2 min;以 1 ℃/min 升温至 105 ℃,保持 1 min;再以 10 ℃/min 升温至 150 ℃,保持 2 min)。

2.2 溶液的制备

2.2.1 供试品溶液 取夜寒苏药材各 100 g,粉碎过 5 号筛,精密称定,加入 15 倍量(1 500 mL)水浸泡 0.5 h,然后按照 2015 年版《中国药典》(四部)“通则 2204”挥发油测定甲法^[8]提取夜寒苏中挥发油,得油状物,冷却后收集密封,置于冰箱中冷藏保存,备用。精密称取挥发油样品适量,置于 10 mL 量瓶中,加正己烷定容至刻度,摇匀,即得。

2.2.2 混合对照品溶液 分别称取 α -蒎烯、 β -蒎烯及芳樟醇对照品 0.072 40、0.078 60、0.135 30 g,精密称定加入正己烷,配制成每 1 mL 含 α -蒎烯 7.240 0 mg、 β -蒎烯 7.860 0 mg、芳樟醇 13.530 0 mg 的混合溶液,即得。

2.2.3 空白对照溶液 取上述作稀释剂的正己烷适量作为空白对照溶液。

2.3 专属性考察

取空白对照溶液、混合对照品溶液和供试品溶液各 1 μL,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱。结果,在该色谱条件下,其他成分对待测成分未见干扰,方法的专属性良好,色谱图详见图 1。

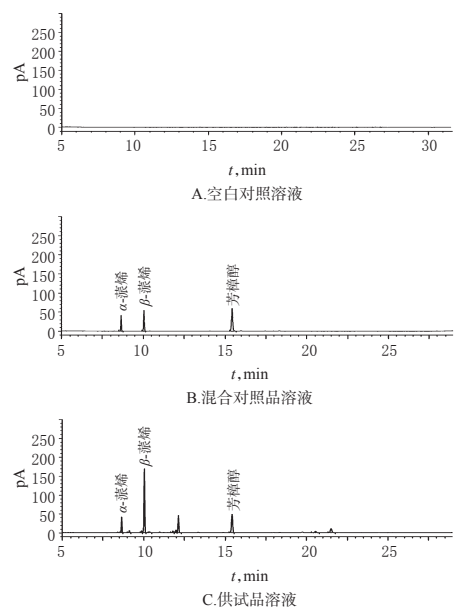


图1 气相色谱图

Fig 1 GC chromatograms

2.4 线性关系考察

精密吸取“2.2.2”项下混合对照品溶液配制成 α -蒎烯含量为 2.413 3、1.448 0、0.724 0、0.362 0、0.181 0、0.090 5 mg/mL, β -蒎烯含量为 2.620 0、1.572 0、0.786 0、0.393 0、0.196 5、0.098 3 mg/mL, 芳樟醇含量为 4.510 0、2.706 0、1.353 0、0.676 5、0.338 3、0.169 1 mg/mL 的系列混合对照品溶液。精密吸取上述溶液 1 μL,分别注入气相色谱仪中,记录色谱。以峰面积为纵坐标(y)、测定对照品质量浓度为横坐标(x)绘制标准曲线,得 α -蒎烯、 β -蒎烯、芳樟醇回归方程分别为 $y=341.55x+1.239 9(r=0.999 9)$ 、 $y=481.04x-1.992 3(r=0.999 9)$ 、 $y=469.99x+10.173(r=0.999 8)$ 。结果表明, α -蒎烯、 β -蒎烯、芳樟醇检测质量浓度线性范围分别为 0.090 5~2.413 3、0.098 3~

2.620 0、0.169 1~4.510 0 mg/mL。

2.5 精密度试验

分别精密吸取“2.2.2”项下的混合对照品溶液 1 μL,按“2.1”项下色谱条件连续进样 6 次,记录峰面积。结果,α-蒎烯、β-蒎烯、芳樟醇峰面积的 RSD 分别为 0.98%、2.02%、0.92% (n=6),表明该仪器精密度良好。

2.6 稳定性试验

精密称取同一批夜寒苏药材(编号:S1)粉末 1 份,按“2.2.1”项下方法制备供试品溶液,分别在室温下放置 0、1、2、4、8、12 h 时按“2.1”项下色谱条件进行测定,记录峰面积。结果,α-蒎烯、β-蒎烯、芳樟醇峰面积的 RSD 分别为 1.89%、1.80%、1.94% (n=6),表明药材中的 α-蒎烯、β-蒎烯、芳樟醇在室温下放置 12 h 内稳定。

2.7 重复性试验

称取同一批夜寒苏药材(编号:S1)粉末 6 份,平行称定,按“2.2.1”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进行测定,记录峰面积。结果,α-蒎烯、β-蒎烯、芳樟醇峰面积的 RSD 分别为 1.98%、1.60%、1.52% (n=6),表明本方法重复性良好。

2.8 准确度试验

称取已知含量的夜寒苏药材(编号:S1)粉末适量,共 6 份,每份约 1 g,平行称定,分别精密加入 α-蒎烯(1.448 0 mg)、β-蒎烯(1.572 0 mg)、芳樟醇(2.706 0 mg)的混合对照品溶液,按“2.2.1”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进行测定,计算其各自的平均加样回收率,结果见表 2。

表 2 加样回收率试验结果 (n=6)

Tab 2 Results of recovery tests (n=6)

成分	样品量,mg	加入量,mg	测得量,mg	加样回收率,%	平均加样回收率,%	RSD,%
α-蒎烯	0.716 2	1.448 0	2.164 2	99.27	99.84	0.49
	0.702 5	1.448 0	2.150 5	99.37		
	0.687 6	1.448 0	2.135 6	99.78		
	0.700 8	1.448 0	2.148 8	100.15		
	0.690 4	1.448 0	2.138 4	100.58		
	0.698 2	1.448 0	2.146 2	99.89		
β-蒎烯	2.384 0	1.572 0	3.956 0	99.21	100.24	1.38
	2.297 2	1.572 0	3.869 2	101.31		
	2.357 4	1.572 0	3.929 4	99.67		
	2.280 6	1.572 0	3.852 6	102.45		
	2.414 4	1.572 0	3.986 4	98.76		
	2.343 2	1.572 0	3.915 2	100.07		
芳樟醇	1.085 2	2.706 0	3.791 2	97.65	99.41	1.67
	1.076 8	2.706 0	3.782 8	97.85		
	0.998 6	2.706 0	3.704 6	99.80		
	0.987 5	2.706 0	3.693 5	100.86		
	0.949 2	2.706 0	3.655 2	101.73		
	1.058 8	2.706 0	3.764 8	98.59		

表 2 结果显示,α-蒎烯、β-蒎烯、芳樟醇的平均加样回收率分别为 99.84%、100.24%、99.41%,其结果在 95%~105% 之间,表明加样回收率良好。

2.9 样品含量测定

分别取 23 批夜寒苏药材粉末各 100 g,精密称定,按“2.2.1”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条

件测定,记录色谱图,结果见表 3。

表 3 23 批夜寒苏样品中挥发油含量及 3 种化合物含量测定结果

Tab 3 Content determination of volatile oil and 3 kinds of compounds in 23 batches of *H. flavum*

编号	产地	挥发油,mL/100 g	α-蒎烯,mg/g	β-蒎烯,mg/g	芳樟醇,mg/g
S1	遵义市	1.6	0.738 8	2.476 8	1.076 2
S2	开阳县	1.5	0.811 5	1.283 2	0.818 8
S3	凯里市	1.2	0.610 7	1.259 6	0.834 3
S4	孟关乡	1.3	0.605 2	0.888 7	0.762 4
S5	织金县	1.1	0.630 2	1.026 4	0.357 4
S6	高坡乡	1.1	0.477 4	1.232 9	0.760 8
S7	花溪区	1.2	0.574 2	0.945 7	0.674 0
S8	二戈寨	1.4	1.325 0	3.172 1	1.021 2
S9	惠水县	1.5	0.675 5	2.318 4	1.039 8
S10	都匀市	1.3	0.502 9	1.172 8	0.635 8
S11	兴义市	1.5	0.659 1	2.039 1	0.540 5
S12	正安县	1.1	0.625 0	1.318 8	0.774 5
S13	乌当区	1.3	0.835 2	1.546 2	1.449 6
S14	龙里县	1.2	0.214 4	1.134 3	0.817 4
S15	余庆县	1.4	0.869 3	1.658 4	1.518 7
S16	普安县	0.8	0.386 1	0.876 5	0.474 9
S17	花溪区	1.2	0.554 0	1.947 8	0.635 7
S18	修文县	1.3	0.511 6	1.288 5	0.818 7
S19	开阳县	1.2	0.682 5	1.098 0	0.672 9
S20	二戈寨	1.3	0.641 8	0.988 9	0.826 1
S21	惠水县	1.1	0.495 4	0.766 2	0.541 4
S22	黄平县	1.3	0.672 6	1.109 5	0.765 2
S23	高坡乡	1.1	0.483 4	1.254 8	0.744 3

由表 3 可见,23 批夜寒苏药材中挥发油含量为 0.8~1.6 mL/100 g,α-蒎烯、β-蒎烯、芳樟醇含量分别在 0.214 4~1.325 0、0.766 2~3.172 1、0.357 4~1.518 7 mg/g 范围内。其中,夜寒苏挥发油含量较高的产地为遵义市、开阳县及兴义市等,普安县的夜寒苏药材中挥发油含量较低。α-蒎烯含量较高地区为遵义市、开阳县、余庆县、乌当区,含量较低地区为高坡乡、惠水县、龙里县及普安县。β-蒎烯含量较高为遵义市、兴义市,含量较低地区为普安县和孟关乡。芳樟醇含量较高地区为遵义市、二戈寨、乌当区、余庆县,含量较低有普安县和织金县。综上所述,23 批夜寒苏药材不论是挥发油含量,还是 3 种成分含量,均存在差异。遵义市样品不论是挥发油含量,还是 3 种成分含量均较高,表明遵义市夜寒苏药材质量较好,提示产地是影响夜寒苏药材质量的因素之一。

3 讨论

3.1 相同产地不同批次含量差异

本研究所采集的 23 批次药材中有 5 个产地分别采集两次样品,而实验结果表明相同产地所采集的药材样品挥发油及所测的 3 种成分含量都存在差异。导致这种结果的原因可能有以下几点:(1)采集地土地肥沃不一致以及生态环境不一样。(2)这几个地方两次采样时间不同,第一次采样在 2016 年,第二次采样在 2017 年,可能与药材的储存时间和生长年限有关。

3.2 化学成分鉴定与分析

虎杖苷对肾纤维化模型大鼠肾组织中MMP-9和TIMP-1蛋白表达的影响

王松*,赵晓玉,梁艳,张英杰,齐跃东*(郑州大学第一附属医院药学部,郑州 450052)

中图分类号 R285.6 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)07-0936-05

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.07.18

摘要 目的:考察虎杖苷对肾纤维化模型大鼠肾组织中基质金属蛋白酶9(MMP-9)和基质金属蛋白酶组织抑制物1(TIMP-1)蛋白表达的影响,探讨其延缓大鼠肾纤维化的作用机制。方法:将40只大鼠随机分为假手术组(生理盐水)、模型组(生理盐水)、虎杖苷组(100 mg/kg)和贝那普利组(阳性对照,5 mg/kg)。除假手术组外,其余各组大鼠均采用单侧输尿管梗阻法制备肾纤维化大鼠模型。术后1 h,各组大鼠灌胃相应药物,每天给药1次。连续给药4周后,检测各组大鼠尿液中 β_2 微球蛋白(β_2 -MG)、N-乙酰- β -D-氨基葡萄糖苷酶(NAG)含量和血清中尿素氮(BUN)、肌酐(Cr)含量;苏木素-伊红染色观察大鼠肾组织病理改变,并进行评分;免疫组织化学法检测大鼠肾组织中MMP-9和TIMP-1蛋白表达。结果:与假手术组比较,模型组大鼠尿液中 β_2 -MG、NAG含量和血清中BUN、Cr含量均显著升高($P < 0.05$),并且大鼠肾组织的病理评分和组织中MMP-9、TIMP-1蛋白的表达水平也显著升高($P < 0.01$)。与模型组比较,虎杖苷组和贝那普利组大鼠肾组织中MMP-9蛋白表达水平持续增高($P < 0.01$),其余各指标水平均显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);且虎杖苷组与贝那普利组比较大鼠各指标水平差异均无统计学意义($P > 0.05$)。结论:虎杖苷延缓大鼠肾纤维化进程的机制可能与上调大鼠肾组织中MMP-9蛋白表达和下调TIMP-1蛋白表达,升高MMP-9/TIMP-1的比值有关。**关键词** 虎杖苷;肾纤维化;单侧输尿管梗阻;基质金属蛋白酶9;基质金属蛋白酶组织抑制物1

近年来,多项研究对夜寒苏挥发油进行了成分鉴定及分析^[9-15]。从报道中可以看出存在两种不同结果:一种是李翔等^[13]将 β -石竹烯定为黄姜花根茎的指标成分;另一种是本课题组及其他学者认为夜寒苏挥发油主要成分为芳樟醇、 α -蒎烯、1,8-桉油精、4-松油酸、 β -蒎烯、 α -松油醇等。导致这种现象的原因有以下几种:(1)实验室所采集的样品是否是同一种植物及同名异物药材。(2)该药材目前尚无不同季节采收时化学成分存在差异的相关报道。(3)是否在试验中有别的成分引入导致这因素。目前尚无法得出确定的结论。

综上,本研究建立了同时测定夜寒苏药材挥发油中 α -蒎烯、 β -蒎烯及芳樟醇3种成分含量的气相色谱法。该方法简单、重复性良好,可用于夜寒苏药材质量标准研究。

参考文献

[1] 中国科学院昆明植物研究所. 云南植物志[M]. 北京: 教育科学出版社, 1997: 11.
[2] 胡秀, 刘念. 中国姜花属 *Hedychium* 野生花卉资源特点[J]. 广东园林, 2009, 31(4): 7-11.
[3] 张彪, 周汉华. 黔产姜花属植物的研究进展[J]. 贵州科学, 2017, 35(4): 21-26.
[4] 贵州植物志编委会. 贵州植物志: 第四卷[M]. 成都: 四川民族出版社, 1989: 686-687.

[5] 贵州省中医研究所. 贵州草药: 第二集[M]. 贵阳: 贵州人民出版社, 1970: 671.
[6] 杨秀泽, 周汉华, 童红. 夜寒苏(圆瓣姜花)的鉴定及挥发油成分GC-MS分析[J]. 中国药房, 2011, 22(7): 642-643.
[7] 周汉华, 赵曦, 梁晓乐. 夜寒苏的鉴定及挥发油成分GC-MS分析[J]. 中药材, 2008, 31(7): 977-979.
[8] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 四部[S]. 2015年版. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 203.
[9] 高杰杰, 郝小江, 何红平, 等. 圆瓣姜花的化学成分研究[J]. 云南中医学院学报, 2013, 36(3): 28-30.
[10] 赵超, 龚小见, 陈华国, 等. 黔产夜寒苏挥发性化学成分固相微萃取/气相色谱/质谱分析[J]. 中华中医药杂志, 2010, 25(7): 1090-1092.
[11] 芦燕玲, 高则睿, 徐世涛, 等. GC-MS法分析姜花属四种植物的挥发性成分[J]. 化学研究与应用, 2013, 25(2): 210-215.
[12] 周露, 练强, 谢文申. 黄姜花根茎的挥发性成分研究[J]. 香料香精化妆品, 2017, 46(4): 11-13.
[13] 李翔, 钟方友, 孟凡冰, 等. 响应面法超声辅助提取黄姜花挥发油及其化学成分分析[J]. 成都大学学报(自然科学版), 2017, 36(4): 346-350.
[14] 张彪, 周汉华, 殷少文, 等. 气相色谱法测定黔产夜寒苏挥发油及其桉油精含量[J]. 亚太传统医药, 2017, 13(9): 28-31.
[15] 周曦曦, 王进喜, 杨坤, 等. 苗药夜寒苏根茎化学成分定性研究[J]. 中国民族医药杂志, 2017, 23(6): 35-36.

* 主管药师, 硕士。研究方向: 药品调剂、临床药学。电话: 0371-66295016。E-mail: 470373072@qq.com

通信作者: 主任药师。研究方向: 临床药学、麻醉药品。电话: 0371-66862639。E-mail: 53212711@qq.com

(收稿日期: 2018-01-03 修回日期: 2018-02-25)

(编辑: 余庆华)