

邸继鹏, 赵艺晨, 彭倩, 等. 基于电雾式检测器的紫苏子及炒紫苏子配方颗粒多成分含量测定[J]. 环境化学, 2023, 42(1): 341-344.

DI Jipeng, ZHAO Yichen, PENG Qian, et al. Determination multi-components contents of *Perilla Frutenscens* seed and fried seed formulations based on charged aerosol detector[J]. Environmental Chemistry, 2023, 42 (1): 341-344.

## 基于电雾式检测器的紫苏子及炒紫苏子配方颗粒多成分含量测定\*

邸继鹏<sup>1</sup> 赵艺晨<sup>2</sup> 彭倩<sup>2</sup> 章军<sup>1</sup> 陈莎<sup>1\*\*</sup> 刘安<sup>1\*\*</sup>

(1. 中国中医科学院中药研究所 中药鉴定与安全性评估北京重点实验室, 北京, 100700; 2. 赛默飞世尔科技(中国)有限公司, 北京, 100007)

**摘要** 建立一种快速、灵敏的电雾式检测器(CAD)方法,同时测定紫苏子及炒紫苏子配方颗粒中多成分的含量.依照中药配方颗粒的制备要求,利用Acclaim Polar Advantage II C<sub>18</sub>(4.6 mm×250 mm, 5 μm)色谱柱,流动相为乙腈(A)-0.1%三氟乙酸水(B),梯度洗脱,分析泵梯度洗脱条件:0—25 min:20%→55%A,25—26 min:55%→95%A;采用Chromleon 7.2梯度补偿泵,流速为0.7 mL·min<sup>-1</sup>,进样体积15 μL.研究表明,通过CAD检测器可以同时检测紫苏子、炒紫苏子的3种特征性成分,无样品基质干扰,*r*大于0.999,精密度相对偏差(RSD)分别为1.35%(迷迭香酸-3-*O*-β-D-葡萄糖苷)、1.19%(3-脱羟基迷迭香酸-3-*O*-β-D-葡萄糖苷)、1.40%(迷迭香酸).通过对10批不同紫苏子和炒紫苏子配方颗粒含量分析,炒紫苏子的3个特征性酚酸类成分含量高于紫苏子含量,其中炒紫苏子中3-去羟基迷迭香酸-3-*O*-β-D-葡萄糖苷含量显著高于紫苏子(*P*=0.017).本方法简便、快速,能同时对紫苏子及炒紫苏子配方颗粒指纹图谱中无标准品的特征性成分进行定量测定.

**关键词** 炒紫苏子,电雾式检测器,配方颗粒,多成分,含量测定.

## Determination multi-components contents of *Perilla Frutenscens* seed and fried seed formulations based on charged aerosol detector

DI Jipeng<sup>1</sup> ZHAO Yichen<sup>2</sup> PENG Qian<sup>2</sup> ZHANG Jun<sup>1</sup> CHEN Sha<sup>1\*\*</sup> LIU An<sup>1\*\*</sup>

(1. Key Laboratory of Beijing for Identification and Safety Evaluation of Chinese Medicine, Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing, 100700, China; 2. Thermo Fisher Scientific (China) Co., Ltd, Beijing, 100007, China)

**Abstract** To establish a rapid and sensitive CAD method for simultaneous determination of multiple components in the formulation particles of *perilla* seeds and their fried products. The Acclaim Polar Advantage II C<sub>18</sub> column (4.6 mm×250 mm, 5 μm) was used for analysis. Acetonitrile as eluent A, 0.1% trifluoroacetic acid in water as eluent B, and the gradient elution conditions were as follows: 0—25 min:20%—55%A; 25—26 min: 55%—95% A, at a flow rate of 0.7 mL·min<sup>-1</sup> and injection volume of 15 μL. A chromleon 7.2 gradient compensation pump was used in this method. Three characteristic components of *perilla* seeds and fried *perilla* seed could be detected simultaneously by CAD detector, without sample matrix interference, *r* was greater than 0.999, and the relative deviation (RSD) of precision were 1.35% (rosmarinic acid-3-*O*-β-D-glucoside), 1.19%

\* 中国中医科学院科技创新工程(CI2021A04515)资助.

Supported by the Science and Technology Innovation Project of Chinese Academy of Traditional Chinese Medicine (CI2021A04515).

\*\* 通信联系人 Corresponding author, Tel: 15010604641, E-mail: schen@icmm.ac.cn; Tel: (8610) 64089808, E-mail: aliu@icmm.ac.cn

(3'-dehydroxy rosin-3-O- $\beta$ -D-glucoside), and 1.40% (rosmarinic acid), respectively. The results showed that the content of three characteristic components in the fried *perilla* seeds was higher than that in the *perilla* seeds, and the content of 3'-dehydroxy rosin-3-O- $\beta$ -D-glucoside in the fried *perilla* seeds was significantly higher than that in the *perilla* seeds ( $P=0.017$ ). The method is simple, rapid and can be used for the quantitative determination of the characteristic components in the fingerprint of *perilla* seed formula granules.

**Keywords** fried *perilla* seeds, charged aerosol detector, formula particles, multi-component, content determination.

紫苏子为唇形科植物紫苏 *Perilla frutescens* (L.) Britt. 的干燥成熟果实, 将其按照标准汤剂的主要质量指标加工即为紫苏子配方颗粒。将其炒制并按标准汤剂的主要质量指标加工, 即为炒紫苏子配方颗粒。目前紫苏子和炒紫苏子配方颗粒标准有对照特征图谱, 一般只对迷迭香酸进行了定量, 有些成分由于无法获得标准品不能很好的进行定量<sup>[1]</sup>。且传统蒸发光检测器来进行定量利用光散射程度来估计分析物的含量, 颗粒散射光的能力取决于其大小, 导致校准曲线复杂<sup>[2]</sup>。电雾式检测器 CAD 实现同时对多种化合物的定量, 对没法获得标准品的化合物的定量具有显著的优势, 在中药材上得到了一些应用和关注<sup>[3-4]</sup>。因此, 建立精确快速有效的成分测定方法, 实现对多成分的含量测定对紫苏子、炒紫苏子配方颗粒的质量控制具有重要意义。

本文利用电雾式检测器(CAD), 建立了一种有效的定性定量方法, 对不同批次紫苏子配方颗粒和炒紫苏子配方颗粒的成分进行分析和比较, 以期对紫苏子配方颗粒质量标准的研究以及紫苏子和炒紫苏子的利用提供科学依据。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器与试剂

Vanquish 高效液相色谱仪(赛默飞世尔科技有限公司, 美国), 包括 Dual Pump CN 双三元泵、Split Sampler CT 自动进样器、Column Compartment H 柱温箱、Charged Aerosol Detector H 电雾式检测器(CAD); ME204T 万分之一天平(梅特勒托利多仪器有限公司); TGL-16M 离心机(湖南湘仪实验仪器开发有限公司); KQ-250DB 超声波清洗仪(昆山市超声仪器有限公司)。

迷迭香酸(批号: 11187-201505, 纯度 98.5%)购自中国食品药品检定研究院; 色谱级乙腈(上海星可高纯溶剂有限公司); 色谱级三氟乙酸(北京迈瑞达科技有限公司); 分析级甲醇(天津市致远化学试剂有限公司); 屈臣氏饮用水(广州屈臣氏食品饮料有限公司); 紫苏子配方颗粒(编号为 S1-S10)分别购自华润三九医药股份有限公司、广东一方制药有限公司、中国中医科学院西苑医院、首都医科大学附属北京中医医院、北京中医药大学东直门医院; 炒紫苏子配方颗粒(编号为 S11-S20)分别购自江阴天江药业有限公司、华润三九医药股份有限公司、北京中医药大学东直门医院、首都医科大学附属北京中医医院(表 1)。

表 1 20 批紫苏子配方颗粒、炒紫苏子配方颗粒样品信息

Table 1 Sample information of twenty batches of *Perilla* seed formula particles and fried *Perilla* seed formula particles

样品	编号	厂家	批号	样品	编号	厂家	批号
紫苏子 配方颗粒	S1	广东一方制药有限公司	A1061291	炒紫苏子 配方颗粒	S11	江阴天江药业有限公司	21066934
	S2	广东一方制药有限公司	0071811		S12	江阴天江药业有限公司	2110084101
	S3	华润三九医药股份有限公司	2112001C		S13	江阴天江药业有限公司	2110085101
	S4	华润三九医药股份有限公司	2112002C		S14	江阴天江药业有限公司	2110086101
	S5	华润三九医药股份有限公司	2010001C		S15	华润三九医药股份有限公司	2006001W
	S6	中国中医科学院西苑医院	20220501		S16	华润三九医药股份有限公司	2006002W
	S7	首都医科大学附属北京中医医院	20220502		S17	华润三九医药股份有限公司	2006003W
	S8	首都医科大学附属北京中医医院	20220503		S18	北京中医药大学东直门医院	20220601
	S9	北京中医药大学东直门医院	20220401		S19	北京中医药大学东直门医院	20220602
	S10	北京中医药大学东直门医院	20220402		S20	首都医科大学附属北京中医医院	20220603

### 1.2 色谱条件

色谱柱: 赛默飞 Acclaim Polar Advantage II C<sub>18</sub>(4.6 mm×250 mm, 5  $\mu$ m) 色谱柱; 柱温为 25  $^{\circ}$ C, 流速为 0.7 mL·min<sup>-1</sup>, 进样体积 15  $\mu$ L, 流动相: 0.1% 三氟乙酸(A)-乙腈(B), 梯度洗脱, 分析泵梯度洗脱条件: 0—25 min: 20%→55% A, 25—26 min: 55%→95% A, 26—31 min: 95% A. 梯度补偿泵梯度采用 Chromeleon 7.2 软件自动计算; CAD 采集频率 5Hz, 过滤常数 3.6s, 蒸发温度 35  $^{\circ}$ C.

### 1.3 溶液的配制

精密称取迷迭香酸对照品适量, 加甲醇溶解, 配制成每 1 mL 中含有迷迭香酸 84.71  $\mu$ g 的迷迭香酸对照品溶液。

分别取紫苏子、炒紫苏子配方颗粒适量, 研细, 称取 0.5 g 置于具塞锥形瓶. 加入 40% 甲醇 25 mL, 密塞, 称定质量. 超声处理 20 min, 冷却, 加 40% 甲醇补足减失质量, 摇匀, 离心, 取上清液经 0.22  $\mu\text{m}$  微孔滤膜滤过, 即得.

## 2 结果与讨论

### 2.1 线性关系考察

称取迷迭香酸对照品加甲醇溶解, 配制成 1 mL 中含有迷迭香酸 225  $\mu\text{g}$  的对照品母液. 加甲醇稀释, 得迷迭香酸质量浓度为 5.60、28.12、56.25、84.71、112.50、225.00  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  的对照品溶液, 按 1.2 节条件测定. 以峰面积为因变量、质量浓度为自变量, 得迷迭香酸回归方程为  $y = 0.0571x + 0.3014$  ( $r = 0.9991$ ), 线性范围为 5.60—225.00  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ .

### 2.2 精密度、重复性和稳定性考察

取炒紫苏子配方颗粒样品 S15 适量, 按 1.3 节方法制备供试品溶液, 按 1.2 节条件连续进样 6 次, 迷迭香酸-3-*O*- $\beta$ -D-葡萄糖苷、3'-脱羟基迷迭香酸-3-*O*- $\beta$ -D-葡萄糖苷、迷迭香酸峰面积的相对标准偏差 (RSD) 分别为 1.35%、1.19%、1.40%, 表明仪器精密度良好.

取炒紫苏子配方颗粒样品 S15 共 6 份, 按 1.3 节方法制备供试品溶液, 按 1.2 节条件连续进样 6 次, 迷迭香酸-3-*O*- $\beta$ -D-葡萄糖苷、3'-脱羟基迷迭香酸-3-*O*- $\beta$ -D-葡萄糖苷、迷迭香酸的平均含量分别为 4.739、0.706、5.553  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ , RSD 分别为 0.43%、1.27%、0.47%, 表明该方法重复性良好.

取炒紫苏子配方颗粒样品 S15 适量, 按 1.3 节方法制备供试品溶液, 分别于制备后 0、4、8、10、12、24 h 按 1.2 节色谱条件测定, 计算迷迭香酸-3-*O*- $\beta$ -D-葡萄糖苷、3'-脱羟基迷迭香酸-3-*O*- $\beta$ -D-葡萄糖苷、迷迭香酸峰面积的 RSD 分别为 1.30%、1.75%、1.24%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定.

### 2.3 加样回收率试验

取已知迷迭香酸含量的炒紫苏子配方颗粒样品 S15 共 6 份, 分别加入等量对照品, 按 1.3 节方法平行制备供试品溶液 6 份, 按 1.2 节色谱条件测定, 计算迷迭香酸平均加样回收率为 101.26%, RSD 为 1.10%, 说明方法准确可靠.

### 2.4 化合物鉴定和样品含量测定

分析紫苏子配方颗粒电喷雾检测器的结果可知, 紫苏子配方颗粒和炒紫苏子配方颗粒特征图谱主要有 3 个峰. 通过超高效色谱四极杆串联飞行时间质谱联用技术, 对紫苏子配方颗粒和炒紫苏子配方颗粒特征图谱中的峰 1 和峰 2 进行鉴定, 峰 1 的分子离子峰  $[\text{M}-\text{H}]^-$   $m/z$  521.1318, 根据其特征碎片以及文献报道<sup>[4]</sup>, 推断其特征碎片  $[\text{M}-\text{H}-\text{Glu}]^-$   $m/z$  359.0790, 中性丢失 162Da 葡萄糖, 峰 1 被鉴定为迷迭香酸-3-*O*- $\beta$ -D-葡萄糖苷. 峰 2 的分子离子峰  $[\text{M}-\text{H}]^-$   $m/z$  505.1357, 根据其特征碎片中性丢失 162Da 葡萄糖, 特征离子  $[\text{M}-\text{H}-\text{Glu}]^-$   $m/z$  343.0848 以及文献报道<sup>[3-4]</sup>, 最后峰 2 被鉴定为 3'-脱羟基迷迭香酸-3-*O*- $\beta$ -D-葡萄糖苷.

以迷迭香酸对照品分别计算迷迭香酸、迷迭香酸-3-*O*- $\beta$ -D-葡萄糖苷、3'-脱羟基迷迭香酸-3-*O*- $\beta$ -D-葡萄糖苷含量 (表 2), 并对所得数据用 SPSS 软件进行成对样本  $t$  检验, 结果见表 3.

表 2 紫苏子和炒紫苏子配方颗粒 3 种成分含量测定

Table 2 Three components contents of *perilla* seeds and fried *perilla* seeds

样品	编号	迷迭香酸	3'-脱羟基迷迭香酸-3- <i>O</i> - $\beta$ -D-葡萄糖苷	迷迭香酸-3- <i>O</i> - $\beta$ -D-葡萄糖苷	样品	编号	迷迭香酸	3'-脱羟基迷迭香酸-3- <i>O</i> - $\beta$ -D-葡萄糖苷	迷迭香酸-3- <i>O</i> - $\beta$ -D-葡萄糖苷
紫苏子 配方颗粒	S1	8.23	0.59	5.70	炒紫苏子 配方颗粒	S11	6.21	0.54	5.23
	S2	8.27	0.63	5.58		S12	8.94	1.09	8.59
	S3	6.85	0.61	5.38		S13	9.32	1.04	8.95
	S4	6.75	0.62	5.28		S14	5.64	0.38	4.07
	S5	8.72	0.49	6.05		S15	5.55	0.71	4.74
	S6	8.36	0.45	5.90		S16	8.07	0.54	5.64
	S7	5.12	0.19	3.73		S17	8.42	0.57	5.87
	S8	5.10	0.22	3.65		S18	6.14	0.57	5.32
	S9	4.89	0.20	3.60		S19	8.80	1.06	8.51
	S10	4.98	0.21	3.60		S20	8.09	0.52	5.69
平均值	6.73	0.42	4.85	平均值	7.52	0.70	6.26		

表 3 配对  $t$  检验分析、效应量

Table 3 Paired t-test analysis and effect amount

名称	平均值差值	标准偏差	$t$	$p$	Cohen's $d$
紫苏子迷迭香酸 配对 炒紫苏子迷迭香酸	-0.791	2.41914	-1.034	0.328	0.327
紫苏子 3'-脱羟基迷迭香酸-3- <i>O</i> - $\beta$ -D-葡萄糖苷 配对 炒紫苏子 3'-脱羟基迷迭香酸-3- <i>O</i> - $\beta$ -D-葡萄糖苷	-0.281	0.30296	-2.933	0.017*	0.927
紫苏子迷迭香酸-3- <i>O</i> - $\beta$ -D-葡萄糖苷 配对 炒紫苏子迷迭香酸-3- <i>O</i> - $\beta$ -D-葡萄糖苷	-1.414	2.13761	-2.092	0.066	0.661

### 3 结论

本试验建立了一种 HPLC-CAD 法,可同时测定紫苏子炒紫苏子中迷迭香酸、迷迭香酸-3-O- $\beta$ -D-葡萄糖苷、3'-脱羟基迷迭香酸-3-O- $\beta$ -D-葡萄糖苷.该方法简单可靠,液相色谱峰分离度好,能同时实现没有标准品的化合物的定量,本研究还对 10 批次紫苏子和炒紫苏子进行了含量测定,通过配对  $t$  检验分析表明:化合物 3'-脱羟基迷迭香酸-3-O- $\beta$ -D-葡萄糖苷在炒紫苏子中显著的高于紫苏子 ( $t = -2.933, P = 0.017$ ).迷迭香酸、迷迭香酸-3-O- $\beta$ -D-葡萄糖苷的含量未呈现出明显的差异,但从样品的平均值来看,炒紫苏子配方颗粒比紫苏子配方颗粒分别高出 11.8%、29.2%.配对样本  $t$  检验使用 Cohen's  $d$  值表示效应量大小(差异幅度大小).

### 参考文献 (References)

- [1] 王永奇,邢福有,刘凡亮,等.紫苏子镇咳、祛痰、平喘作用的药理研究 [J]. *中南药学*, 2003, 1(3): 4.
- [2] XU X Y, WANG S M, WANG H M, et al. Simultaneous quantitative assays of 15 ginsenosides from 119 batches of ginseng samples representing 12 traditional Chinese medicines by ultra-high performance liquid chromatography coupled with charged aerosol detector [J]. *Journal of Chromatography A*, 2021, 1655(11): 462504.
- [3] MARCELA H, DALIBOR Š, FRANTIŠEK Š et al. UHPLC coupled with charged aerosol detector for rapid separation of steviol glycosides in commercial sweeteners and extract of stevia rebaudiana [J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2021, 207(5): 114398.
- [4] 杜靓,杨夏,孙晓丽. HPLC法测定中药材紫苏子中迷迭香酸的含量 [J]. *中国处方药*, 2015, 13(10): 31-32.