

DOI:10.3724/SP.J.1008.2012.00924

结合 GC-MS 技术和多元统计方法评价中药罗布麻的质量

梁珊珊¹, 赵亮¹, 张海¹, 谭光国², 柴逸峰², 张国庆^{1*}

1. 第二军医大学东方肝胆外科医院药材科, 上海 200438

2. 第二军医大学药学院药物分析学教研室, 上海 200433

[关键词] 罗布麻; 挥发油; 气相色谱-质谱法; 多元分析; 质量评价

[中图分类号] R 284.1 [文献标志码] B [文章编号] 0258-879X(2012)08-0924-04

GC-MS combined with multivariate statistical method for evaluating quality of *Apocynum venetum*

LIANG Shan-shan¹, ZHAO Liang¹, ZHANG Hai¹, TAN Guang-guo², CHAI Yi-feng², ZHANG Guo-qing^{1*}

1. Department of Pharmacy, Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200438, China

2. Department of Drug Analysis, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[Key words] *Apocynum venetum* L.; essential oil; gas-chromatography-mass spectrometry; multivariate analysis; quality evaluation

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2012, 33(8):924-927]

罗布麻叶为夹竹桃科多年生草本植物罗布麻(*Apocynum venetum* L.)的干燥叶^[1]。罗布麻中含黄酮类化合物、生物碱、强心苷、氨基酸和微量元素^[2], 用于治疗高血压病、心悸头晕、慢性支气管炎、高血脂等病症^[3]。罗布麻遍布于我国华北、西北及黄河流域的盐碱沙荒地区, 资源丰富^[4]。罗布麻化学成分复杂, 挥发油是其主要的活性成分之一^[5]。罗布麻叶的挥发油由于产地、品种、生长环境、栽培变异等因素的影响而有较大区别^[6]。因此, 全面表征罗布麻挥发性化学成分, 筛选不同来源罗布麻的化学生物标志物, 对于罗布麻的质量评价十分有必要。本研究采用顶空气相色谱-质谱(GC-MS)联用技术对来源于新疆、吉林、天津、江苏4个不同产地的20批罗布麻的挥发性成分进行鉴别以及含量测定, 并且结合主成分分析(PCA)等多元统计技术的组合分析方法, 筛选出对于质量评价起主要影响的化学差异标志物, 为综合评价不同产地的罗布麻药材提供一定的实验依据。

1 仪器和试剂

Thermo Trace GC Ultra 型气相色谱仪(美国赛默飞世尔公司), Thermo DSQ II 质谱仪, 配置 Triplus 顶空进样装置和 Xcalibur 色谱处理软件。十万分之一电子天平(美国梅特勒公司); 上海淀久 DJ-04 药材粉碎机。

20批罗布麻药材(新疆5批、江苏5批、吉林5批、天津5批)分别从当地医药公司购买, 均由第二军医大学药学院生药学教研室孙莲娜副教授鉴定为夹竹桃科植物罗布麻的干燥叶。

2 方法和结果

2.1 GC-MS 供试品溶液的制备 将20批罗布麻药材等重

粉末混合, 得到质控混合样品。称取罗布麻粉末0.2 g, 置顶空瓶中, 加入2 ml 水, 顶空瓶平衡温度90℃, 平衡时间30 min, 顶空进样量1.5 ml。

2.2 色谱及质谱条件 色谱柱为 HP-5 石英毛细管色谱柱(30 m×0.25 mm×0.25 μm), 进样温度250℃, 程序升温, 柱初始温度为50℃, 保持3 min, 以20℃/min 升至150℃, 最后以4℃/min 升至200℃, 保持10 min。载气: 高纯度氦气; 流速: 1.0 ml/min, 分流比为10:1。

质谱离子源为 EI, 电离电压70 eV, 离子源温度240℃, 溶剂延迟时间2 min, 质谱范围 m/z 50~650。总离子流图中各峰通过与质谱数据库 NIST05 标准谱库进行检索以鉴别。

2.3 系统重现性考察 在实验开始, 连续进样多针合并质量控制样品面确保仪器处于稳定状态, 然后进样分析5个罗布麻样品, 再进1针质量控制样品, 再进5个罗布麻样品, 如此反复。本研究考察了 GC-MS 中5个质量控制样品中的5个主要指纹峰, 保留时间分别为3.55、4.41、13.93、18.79、25.74 min, 峰强度的 RSD 为3.53%。说明该方法稳定可靠, 重现性良好, 所得数据可靠, 可满足后续数据分析的要求。

2.4 GC-MS 鉴别结果 对不同产地及种属罗布麻叶所提挥发油按上述测试条件进行 GC-MS 分析。对每个色谱峰的化合物给出特定的 MS 峰, 经计算机库贮存信号的检索及对质谱图进行解析确定化合物, 并用峰面积归一法计算各组分的相对百分含量。鉴别结果见图1、表1。结果显示1-乙烷环丙醇、2-乙烷呋喃、五亚甲基六胺、2-乙炔醛、乙醛、环三硅醚、2,5,5-三甲基-1-乙炔-3-炔、2,4-二甲基苯炔、安息香醛、2-戊基呋喃、反式-2-戊烯基呋喃、八甲基-环化四氢硅氧烷、壬醛、1,2,3,5,6,8a-六氢-4,7-二甲基-1-(1-甲基)-萘等化合物是

[收稿日期] 2011-12-26

[接受日期] 2012-04-23

[作者简介] 梁珊珊, 硕士生. E-mail: shanshan0543401@163.com

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 021-81875571, E-mail: gqzhang@smmu.edu.cn

罗布麻中的主要挥发性成分。

2.5 数据处理 GC-MS 碎片离子信号比较多, 经过手动筛选以后, 得到 923 个信号离子, 首先采用非监督的 PCA 法进行分析(图 2A), 可以看出新疆组与其他 3 组分离明显, 江苏组也成独立的一块。但是天津组和吉林组聚在一起, 不能分开, 原因可能是两地距离较近, 植物生长环境比较类似, 因此挥发油的成分和含量也比较接近。采用有监督的 PLS-DA 方法分析(图 2B), 可以看到 4 组有更好的分离, 说明地理因素的确是影响药品挥发性成分的一个关键因素。

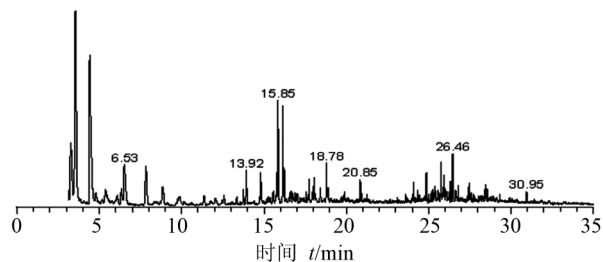


图 1 罗布麻挥发油的 GC-MS 的总离子流图

表 1 罗布麻挥发性成分鉴别结果

No.	化合物	保留时间 <i>t</i> /min	相对含量 (%)
1	1-乙烷环丙醇	3.28	6.08
2	2-乙烷呋喃	3.55	17.31
3	五亚甲基六胺	4.41	14.48
4	3-亚甲基-异葵烯	4.79	0.69
5	3-苯硫基-3-氟-2-三氟-丙烯腈	5.16	0.25
6	2-乙烯醛	5.38	1.58
7	反式-1,2-二甲基-环丁烷	6.09	0.83
8	2-乙基-5-甲基-呋喃	6.33	1.10
9	乙醛	6.51	3.97
10	环三硅醚	7.84	3.80
11	1,2-双(4-氨基-3-呋喃基)炔-乙烷	8.31	0.26
12	2,5,5-三甲基-1-乙烯-3-炔	8.86	1.92
13	2,3-二甲基-1,3-庚二烯	9.89	1.03
14	三甲基(2-苯基乙氧基)-硅烷	10.59	0.23
15	1,3-反-5-顺-辛三烯	11.35	0.78
16	4-甲基乙基-环己烷	12.05	0.60
17	赖氨酸	12.48	0.35
18	庚醛	12.57	0.46
19	4-乙基苯酚	13.34	0.38
20	2-萘烯	13.74	0.71
21	2,4-二甲基苯炔	13.92	1.67
22	安息香醛	14.80	1.98
23	1-亚甲基-4-(1-甲基-乙烯基)-环己烷	15.28	0.38
24	3,5,5-三甲基-1-己烯	15.37	0.35
25	1-辛烯-3-醇酯	15.56	0.58
26	6-甲基-5-庚烯	15.76	1.18
27	2-戊基呋喃	15.85	4.26
28	反式-2-戊烯基呋喃	16.15	3.50
29	八甲基-环化四氢硅氧烷	16.23	1.55
30	罗勒烯	16.61	0.41
31	4-甲基-2-丙烯-呋喃	16.66	0.38
32	1-甲基-2-(1-甲基乙基)-苯	16.76	0.33
33	(S)-1-甲基-4-(1-甲基乙基)-环己烯	16.87	0.39
34	4-甲基-3-环丙烯-1-甲醛	16.98	0.44
35	2,6,6-三甲基-环己酮	17.04	0.30
36	反式-1,4a,5,6,7,8,9,9a-八氢-4a-甲基-2H-苯环辛烷-2-酮	17.57	0.32
37	1-氯-辛烷	17.74	1.07
38	4-甲基苯甲醛	17.93	0.43
39	顺式-5-乙基-四氢化- α , α ,5-三甲基-2-糠醇	18.04	1.25
40	顺式-2-亚甲基-3-(1-甲基乙基)-环己醇-醋酸盐	18.12	0.29
41	5-亚甲基-6-1-甲基乙基-3-环己醇-1-羟基-醋酸盐	18.43	0.62
42	壬醛	18.79	1.52
43	2,5-二甲基-环己醇	18.89	0.58
44	十甲基-环五聚二甲基硅氧烷	19.91	0.37

续表

No.	化合物	保留时间 <i>t</i> /min	相对含量 (%)
45	十八碳三烯酸	20.32	0.25
46	2,6,6-三甲基-1,3-环己二烯-1-甲醛	20.85	0.71
47	葵醛	20.92	0.28
48	十二甲基-环己硅氧烷	23.12	0.47
49	毕橙茄烯	23.62	0.27
50	依兰烯	24.02	0.26
51	古巴烯	24.10	0.65
52	正十四碳烷	24.35	0.36
53	石竹烯	24.86	0.99
54	6-甲基-5-异丙基-3,6,9-三亚乙基四胺	25.00	0.25
55	甘菊蓝	25.18	0.33
56	特-十六烷基	25.27	0.42
57	2,6,10,14-四甲基-十七烷	25.36	0.44
58	α -石竹烯	25.41	0.23
59	2,6-二(1,1-双甲基乙基)-2,5-环己二烯-1,4-二酮	25.56	0.57
60	1,2,3,4,4a,5,6,8a-八氢-7-甲基-4-亚甲基-1-(1-甲基乙基)-萘	25.74	1.26
61	(2S)1,3,4,5,6,7-六氢-1,1,5,5-四甲基-2H-2,4a-亚甲基萘	25.80	0.26
62	2-异丙基烯-4a,8-二甲基-1,2,3,4,4a,5,6,7-八氢萘	25.87	0.72
63	1-氯十六烷	25.95	0.98
64	1- α -S-十氢-1,1,3a-三甲基-7-亚甲基-萘	26.07	0.79
65	丁羟基甲苯	26.25	0.30
66	1,2,3,4,4a,5,6,8a-八氢-7-甲基-4-亚甲基-1-(1-甲基乙基)-萘	26.34	0.63
67	1,2,3,5,6,8a-六氢-4,7-二甲基-1-(1-甲基乙基)-萘	26.46	1.68
68	(R)-2(4H)-5,6,7,7a-四氢化-4,4,7a-三甲基-苯并呋喃酮	26.64	0.77
69	芳萜醇	26.79	0.54
70	十八烷基磺酰氯	27.45	0.81
71	桉醇	27.57	0.33
72	异雪松醇	27.74	0.26
73	2,5,9-三甲基-4,8-二烯酮	27.82	0.28
74	愈创烯	28.13	0.34
75	桉叶醇	28.45	0.94
76	桉醇	28.55	0.36
77	1-氯二十一碳烷	29.33	0.39
78	3,5-二-特-叔丁基-4-水杨醛	29.92	0.23
79	4,4'-苯亚甲基-双(N,N-二甲苯胺)	30.07	0.23
80	6,10,14-三甲基-2-十五烷酮	30.95	0.44

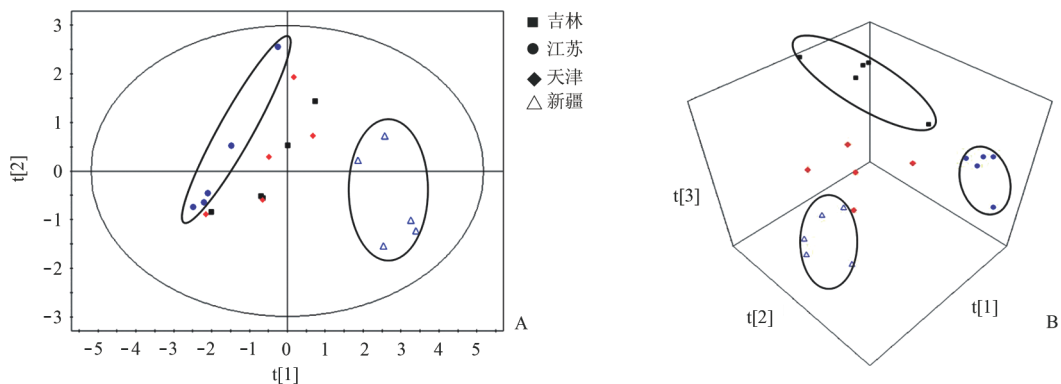


图2 GC-MS数据的PCA图(A)和PLS-DA图(B)

S-plot 载荷图分析见图3。我们根据“在 $w^*c[1]$ 轴, 离原点越远的化合物对分类贡献越大, 具有更高置信度”的原

则找到7种化合物, 分别是1-乙烷环丙醇、2-乙烷咪喃、五亚甲基六胺、2,5,5-三甲基-1-乙烯-3-炔、2-戊基咪喃、反式-2-戊

烯基咪喃、八甲基-环化四氢硅氧烷, 它们对于不同产地的罗布麻的挥发性成分的质量评价起主要的作用。我们对 20 批不同产地罗布麻的 7 种挥发性成分的相对百分含量进行分析, 发现江苏产药材中这 7 种化合物的总含量最高, 而新疆产药材的含量最低。每组含量最高的化合物五亚甲基六胺在江苏产药材中含量最高, 在新疆产药材中最低; 而含量较高的化合物 2-乙烷咪喃和 1-乙烷环丙醇在新疆产药材中的含量最高, 而在江苏产药材中最低; 吉林及天津产药材的这 7 种化合物含量比较接近, 与前面所得到的结果一致。见表 2。

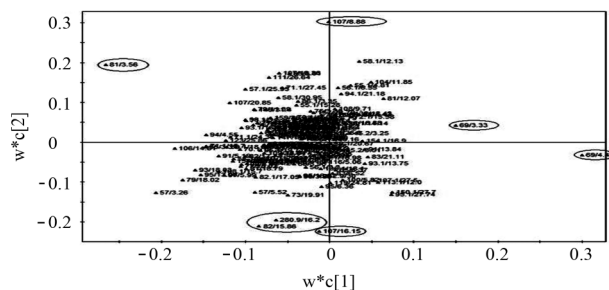


图 3 GC-MS 得分图

表 2 不同产地罗布麻药材各指标成分的含量

分组	1-乙烷环丙醇	2-乙烷咪喃	五亚甲基六胺	2,5,5-三甲基-1-乙炔-3-炔	2-戊基咪喃	反式-2-戊烯基咪喃	八甲基-环化四氢硅氧烷	总含量
江苏组	7.03	13.75	23.79	2.06	4.45	5.34	1.67	58.10
天津组	6.13	17.24	18.66	2.85	4.93	3.63	1.19	54.62
吉林组	6.13	17.11	17.80	3.20	4.32	3.28	1.30	53.14
新疆组	8.28	17.45	12.14	2.68	2.50	3.42	1.57	48.03

3 讨论

3.1 药材提取方法的优化 传统的水蒸气蒸馏法(SD法)在挥发油提取中需要耗费大量的时间、药材和溶剂, 对于批量药材的处理很麻烦, 并且 SD 法局限于提取后要立即进行检测以免物质变质, 同时, 在检测前, 需要加入特定的有机溶剂才能进样, 前处理十分烦琐。采用 GC-MS 测定, 样品前处理简便易行, 并可防止样品溶液直接进样后对色谱系统带来的干扰以及对进样口和色谱柱造成的污染^[7]。

3.2 GC-MS 条件的优化 GC 条件主要考察了程序升温的过程, 经过一系列优化, 保证了采样时间短、峰容量大、分离度好。MS 条件主要是对质谱检测范围的选择, 在查阅相关文献并分析了罗布麻中可能的挥发性成分后, 选择了 m/z 50~650, 所获质谱图具有良好的重现性。

3.3 数据处理方法 多元统计分析对于中药化学标志物的筛选提供了可行性, 数学算法可用于鉴定对不同来源药材聚类起主要作用的色谱峰(化学成分)^[8]。结合 GC-MS 和多变量统计分析方法, 不同来源药材的差异性成分可以被发现。本研究对来源于新疆、吉林、天津、江苏 4 个不同产地的 20 批罗布麻药材得到的 GC-MS 数据进行分析, 以鉴别潜在的化学标志物。GC-MS 原始数据分别通过 Data Converter 软件输出为 mzData 和 CDF 格式的数据。然后用 XCMS 工具箱处理(<http://meltin.scripps.edu/download/>), 导出数据表(TSV 格式)。GC-MS 采用的是 EI 源, 得到的碎片离子较多, 不利于数据的筛选, 本研究以 0.01 min 为筛选单位, 选择每一个单位中丰度最大的离子, 以排除多余碎片离子的干扰。把数据输入到 Matlab7.0 软件进行归一化数据前处理, 然后进行多元统计分析。生成的三维矩阵包括峰指数(保留时间-荷质比)、样品名称、归一化峰面积。将生成的三维矩阵导入 Simca-P 11.5(Umetrics, Umeå, Sweden), 运用模式识别技术进行数据的可视化处理。

本研究采用 GC-MS 分析了来源于 4 个产地的 20 批罗

布麻药材, 分析时间短, 分离效果好, 得到的谱图和数据都显示了 4 组罗布麻样品准确的质量信息和明显的差异。本研究建立的方法能够快速分离和鉴别复杂中药的挥发性成分, 适用于批量药材的处理, 在不牺牲分析质量的前提下, 可以快速分析含有大量挥发性成分的中药, 结果可靠, 得到的差异性标志物对于评价其他产地的罗布麻药材挥发性成分的质量提供一定的依据。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

【参考文献】

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 一部. 北京: 化学工业出版社, 2010: 196.
- [2] Kim D, Yokozawa T, Hattori M, Kadota S, Namba T. Effects of aqueous extracts of *Apocynum venetum* leaves on spontaneously hypertensive, renal hypertensive and NaCl fed hypertensive rats [J]. J Ethnopharmacol, 2000, 72: 53-59.
- [3] 李庆华, 魏春雁, 李建东. 罗布麻叶药理作用及临床应用研究进展[J]. 中药材, 2008, 31: 784-787.
- [4] 张卫明, 肖正春, 顾龚平, 张广伦, 钱学射. 罗布麻资源利用与罗布麻植物分类问题[J]. 中国野生植物资源, 2006, 25: 15-19.
- [5] 陈明鸽, 侯冬岩, 回瑞华. 罗布麻叶挥发油的提取与气相色谱-质谱分析[J]. 鞍山师范学院学报, 2005, 7: 61-63.
- [6] 相泓华, 张月婵, 刘训红, 宋建平. 不同采收期罗布麻叶的色谱图分析[J]. 现代中药研究与实践, 2010, 24: 28-31.
- [7] 吕狄亚, 姜子洋, 李玲, 曹岩, 张海, 柴逸峰. 采用顶空气相色谱-质谱联用法快速分析中药莪术中挥发性成分[J]. 中药材, 2010, 33: 1732-1736.
- [8] Chen Y, Zhu S B, Xie M Y, Nie S P, Liu W, Li C, et al. Quality control and original discrimination of *Ganoderma lucidum* based on high-performance liquid chromatographic fingerprints and combined chemometrics methods[J]. Anal Chim Acta, 2008, 623: 146-152.

【本文编辑】尹 茶