

DOI:10.3724/SP.J.1008.2013.00190

· 论 著 ·

采用顶空气相色谱-质谱技术对不同产地莪术进行快速鉴别

吕狄亚[△], 曹岩[△], 董昕, 李玲, 娄子洋*, 柴逸峰*

第二军医大学药学院药物分析学教研室, 上海市药物(中药)代谢产物研究重点实验室, 上海 200433

[摘要] **目的** 运用顶空气相色谱-质谱(HS-GC/MS)结合化学计量学方法对不同产地莪术进行鉴别, 以便莪术的质量控制研究。**方法** 采用 HP-5 石英毛细管色谱柱(30 m×0.32 mm, 0.25 μm), 进样口温度 250℃, 柱初始温度为 50℃, 保持 3 min, 以 20℃/min 升至 150℃, 最后以 2℃/min 升至 200℃, 保持 10 min, 分流比 10:1。载气为氦气, 流速:1.0 mL/min。顶空瓶区域温度:90℃; 样品瓶加热平衡时间:30 min; 进样量:1.5 mL。结合主成分分析和聚类分析方法对数据进行分析。**结果** 在15个批次的样品的图谱中选取 18 个共有色谱峰进行鉴定, 采用主成分分析法能够有效地区分四川、广西和云南等不同产地的莪术药材, 并明确了对药材造成差异的主要成分为 β-榄香烯、蒎烯、β-蒎烯、p-menth-1-en-8-ol、桉叶素、8,9-去氢-9-甲酰基-环异长叶烯。**结论** 应用 HS-GC/MS 技术与化学计量学方法相结合, 建立了鉴别区分不同产地来源的莪术药材的方法, 并找到了莪术中分类起主要作用的特征性成分。

[关键词] 莪术; 顶空气相色谱-质谱法; 主成分分析; 聚类分析**[中图分类号]** R 931.5 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2013)02-0190-05

Headspace GC-MS for fast identification of *Rhizoma curcuma* of different origins

LÜ Di-ya[△], CAO Yan[△], DONG Xin, LI Ling, LOU Zi-yang*, CHAI Yi-feng*

Department of Pharmaceutical Analysis, Shanghai Key Laboratory for Pharmaceutical (Chinese Materia Medica) Metabolite Research, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[Abstract] **Objective** To distinguish *Rhizoma curcuma* of different origins using headspace-gas chromatography/mass spectrometry (HS-GC/MS) combined with principal components analysis (PCA) and hierarchical cluster analysis (HCA), so as to help the quality control of *Rhizoma curcuma*. **Methods** HP-5 capillary column (30 m×0.32 mm, 0.25 μm) was used under the following condition; inlet temperature: 250℃, initial column temperature: 50℃ maintained for 3 min, then increasing to 150℃ at 20℃/min and to 200℃ at 2℃/min, maintained for 10 min, with the split ratio being 10:1. The carrier gas was helium, with flow rate being 1.0 mL/min, headspace vials regional temperature being 90℃, vials heating equilibration time being 30 min, and injection volume being 1.5 mL. The effect of extract separation conditions, temperature of the vial and equilibrium time on the extraction volatile components of *Rhizoma curcuma* were observed. **Results** PCA could distinguish 18 common peaks of 15 batches of *Rhizoma curcuma* from Sichuan, Guangxi and Yunnan, and it was confirmed that β-elemene, camphene, β-pinene, p-menth-1-en-8-ol, eucalyptol, and cycloisolongifolene, 8,9-dehydro-9-formyl were the main components to cause differences in *Rhizoma curcuma* of different origins. **Conclusion** We have established a method combining HS-GC/MS with PCA and HCA to distinguish *Rhizoma curcuma* of different origins, and we have also identified the major characteristic components of *Rhizoma curcuma* of different origins.

[Key words] *Rhizoma curcuma*; headspace-gas chromatography-mass spectrometry; principal component analysis; hierarchical cluster analysis

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2013, 34(2):190-194]

中药莪术(*Rhizoma curcuma*)为姜科植物蓬莪术(*Curcuma phaeocaulis* Valetton)、广西莪术(*Curcuma kwangsiensis* S. G. Lee et C. F. Liang)或温郁金(*Curcuma wenyujin* Y. H. Chen et C. Ling)

[收稿日期] 2012-10-25 **[接受日期]** 2012-12-14**[基金项目]** 国家自然科学基金(81273472). Supported by National Natural Science Foundation of China(81273472).**[作者简介]** 吕狄亚, 博士生. E-mail: diyav2008@yahoo.com.cn; 曹岩, 博士生. E-mail: caoyan@msn.cn[△]共同第一作者(Co-first authors).

* 通信作者(Corresponding authors). Tel: 021-81871335, E-mail: louziyang@126.com; Tel: 021-81871201, E-mail: yfchai@smmu.edu.cn

的干燥根茎^[1]。据《药性论》记载,莪术主要具有活血化瘀、减轻疼痛等功效。莪术中主要成分为挥发油和姜黄素,其中挥发油为莪术抗肿瘤的有效成分^[2]。莪术主产于华南地区和西南地区,在其他一些省份亦有产出,且存在区域性习用品。根据《中华人民共和国药典》规定,广西莪术为莪术的道地药材。人们普遍认为莪术道地药材的质量优势是不可取代的,某些地方习用品与正品莪术在药理作用上存在一定差异,因而需要被准确鉴别。

药材中挥发性成分常见的提取方法是传统的水蒸气蒸馏法(steam distillation, SD),该法具有提取效率高、操作简便等优点,然而其提取温度较高,一些遇热不稳定的化学成分可能会发生结构的改变,引起挥发油的变质^[3-6]。近年来,提取挥发性成分的方法不断改进,如加压液相萃取法(pressurized liquid extraction, PLE)^[7-9]、固相萃取法(solid-phase extraction, SPE)^[10]等,但这些方法都需要在提取后对样品进行预处理方可进样。本实验采用顶空气相色谱-质谱法(headspace-gas chromatography/mass spectrometry, HS-GC/MS)^[11]对莪术药材进行分析,无需样品预处理,并可避免直接进样后样品对色谱系统带来的干扰和对进样口及色谱柱造成的污染。

主成分分析(principal components analysis, PCA)^[12]是一种化学计量学方法,用于简化数据,快速实现模式或关系的可视化识别,现已广泛应用于中药复杂体系的分析中。聚类分析(hierarchical cluster analysis, HCA)^[13]是利用同类样本应彼此相似,相类似的样本在多维空间中彼此的距离应小些,而不相似的样本在多维空间中彼此的距离应大些,使相似的样本“聚”在一起,从而达到分类的目的。

本实验采用 HS-GC/MS 法对 15 批次 3 个不同产地莪术中主要成分进行区分和鉴别,并结合 PCA 和 HCA 的数据分析方法进行统计分析。

1 材料和方法

1.1 仪器 Thermo Trace GC Ultra 型气相色谱仪(赛默飞世尔科技,美国),配置 Triplus 顶空进样装置和 Xcalibur 色谱处理软件。METTLER AE240 型十万分之一电子天平(梅特勒-托利多公司,美国)。

1.2 试剂和试药 共收集 15 批次,分别产自四川(样品 1~6)、广西(样品 7~11)和云南(样品 12~15)的莪术药材。样品均经第二军医大学药学院生药学教研室孙莲娜副教授鉴定为各自类别。水为纯

净水,甲醇为色谱纯(Fisher, USA)。

1.3 顶空进样 称取莪术粉末 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,进样量 1.5 mL。

1.4 气相条件 色谱柱为 HP-5 石英毛细管色谱柱(30 m×0.32 mm, 0.25 μm),进样口温度 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 2℃/min 升至 200℃,保持 10 min。载气:高纯度氦气;流速:1.0 mL/min,分流比 10:1。

1.5 质谱条件 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 50~550 amu(原子质量单位)。

1.6 统计学处理 采用 PCA 和 HCA 的数据分析方法对各样品的 HS-GC/MS 所得数据进行分析。

2 结果

2.1 数据采集 各样品溶液均进样 1.5 mL,得到各个产地莪术药材的总离子流图谱。如图 1 所示,可见不同产地的莪术在峰的数量、位置和丰度上存在明显差异。总离子流图中各峰鉴定以质谱数据库 NIST 05 标准谱库进行检索。通过 Xcalibur 色谱处理软件得到莪术样品 HS-GC/MS 总离子流图(total ion chromatograms, TIC)、提取保留时间、峰面积等信息,将数据整合匹配并转换为 Excel 文件。该 Excel 文件包含了所有样品的共有成分和各自不同的特征成分。

PCA 中,峰面积较大的峰占有较大的权重,而峰面积小的峰所占权重相对较低,对结果的影响也很小。因此,选取峰面积较大的 18 个色谱峰(保留时间分别为 3.23、3.38、3.59、4.01、4.97、5.08、5.15、5.34、6.08、6.51、7.19、7.71、8.27、8.85、11.14、13.64、14.24、14.48 min)作为 15 个样品的共有峰,采用多点校正方法进行保留时间校正,再对色谱峰进行匹配(如表 1 所示)。以 18 个共有峰的峰面积作为变量,得到 15×18 的数据矩阵,分别使用 SIMACA-P 11.5 Demo 软件和自编程序(MATLAB R2007a)进行 PCA 和 HCA。

2.2 PCA 结果 将二维数据矩阵(包含多成分峰面积数据)导入到 SIMACA-P 11.5 Demo 软件进行多变量统计分析。数据集在进行 PCA 分析之前先进行均值中心化(mean-centered)和帕雷托变换(parscaled)的预处理。PCA 通过有限个主成解释释尽量多的变量信息。第一主成分的方差贡献率为 0.438,第二主成分的方差贡献率为 0.300,第三主成

分的方差贡献率为 0.109,前 3 个主成分的累计方差贡献率为 0.846。图 2 为 15 批次药材的前 2 个主成分的空间分布图。从图中可见同一省份的样品在分

布上相对集中,不同省份的样品在分布上则有明显差异。结果表明,采用 PCA 方法能够有效地区分四川、广西和云南的莪术药材。

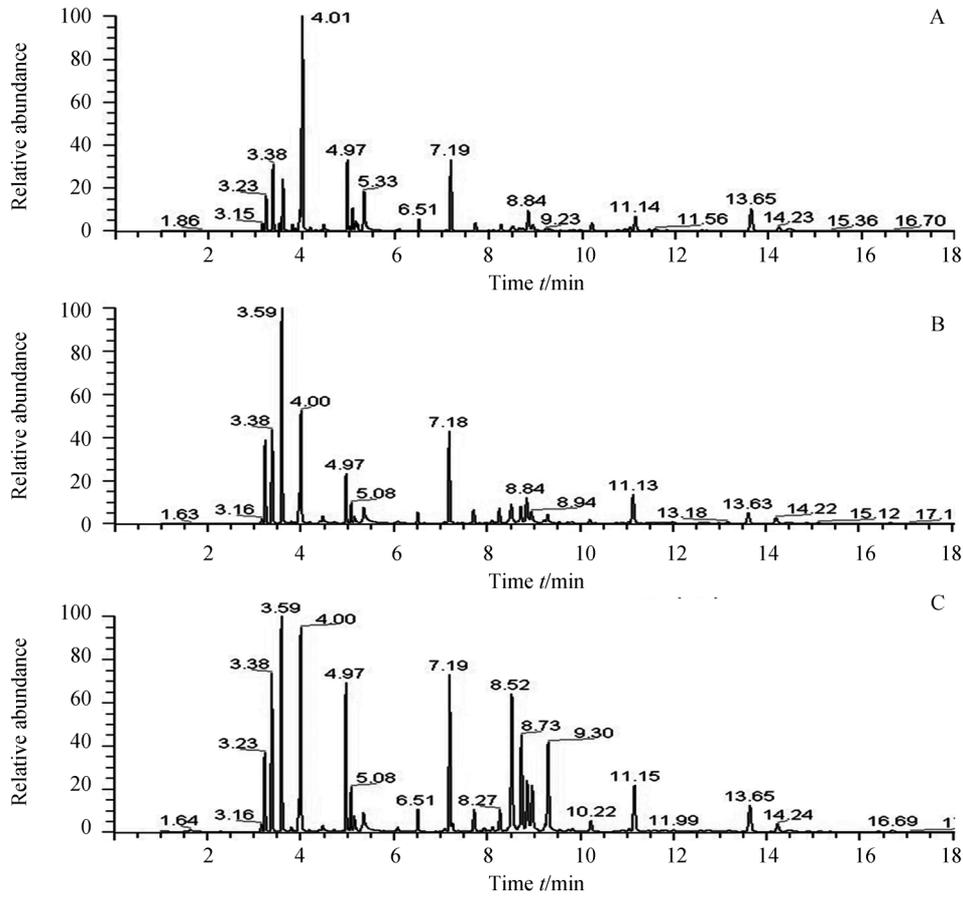


图 1 不同产地莪术的总离子流

Fig 1 Total ion chromatograms (TIC) of *Rhizoma curcuma* from different provinces

A: Sichuan *Rhizoma curcuma*; B: Guangxi *Rhizoma curcuma*; C: Yunnan *Rhizoma curcuma*

表 1 15 批次莪术样品共有峰的鉴定

Tab 1 Identification of the common peaks from 15 batches of *Rhizoma curcuma*

No.	Retention time <i>t</i> /min	Compound	Molecular formula	<i>M_w</i>	RSI
1	3.23	α -Pinene	C ₁₀ H ₁₆	136	931
2	3.38	Camphene	C ₁₀ H ₁₆	136	958
3	3.59	β -Pinene	C ₁₀ H ₁₆	136	937
4	4.01	Eucalyptol	C ₁₀ H ₁₈ O	154	879
5	4.97	Bicyclo[2.2.1]heptan-2-one, 1,7,7-trimethyl-, (1S)-	C ₁₀ H ₁₆ O	152	955
6	5.08	Borneol	C ₁₀ H ₁₈ O	154	960
7	5.15	Isoborneol	C ₁₀ H ₁₈ O	154	926
8	5.34	<i>p</i> -Menth-1-en-8-ol	C ₁₀ H ₁₈ O	154	864
9	6.08	Bornyl acetate	C ₁₂ H ₂₀ O ₂	196	887
10	6.51	Cyclohexene, 4-ethenyl-4-methyl-3-(1-methylethenyl)-1-(1-methylethyl)-, (3R-trans)-	C ₁₅ H ₂₄	204	914
11	7.19	β -Elemene	C ₁₅ H ₂₄	204	926
12	7.71	ζ -Elemene	C ₁₅ H ₂₄	204	910
13	8.27	α -Caryophyllene	C ₁₅ H ₂₄	204	924
14	8.85	Benzofuran, 6-ethenyl-4,5,6,7-tetrahydro-3,6-dimethyl-5-isopropenyl-, trans-	C ₁₅ H ₂₀ O	216	915
15	11.14	Cycloisolongifolene, 8,9-dehydro-9-formyl-	C ₁₆ H ₂₂ O	230	729
16	13.64	3,7-Cyclodecadien-1-one, 3,7-dimethyl-10-(1-methylethylidene)-, (E,E)-	C ₁₅ H ₂₂ O	218	933
17	14.24	Neocurdione	C ₁₅ H ₂₄ O ₂	236	915
18	14.48	Tricyclo[5.1.0.0(2,4)]oct-5-ene-5-propanoic acid, 3,3,8,8-tetramethyl-	C ₁₅ H ₂₂ O ₂	234	761

RSI: Relative similarity index

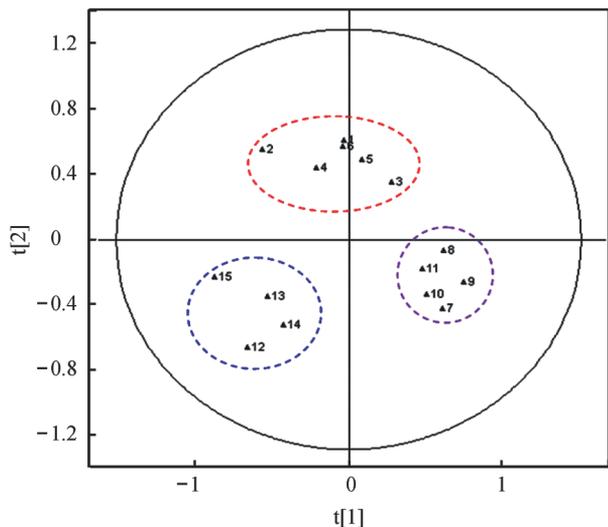


图 2 15 批莪术样品的主成分分析 (PCA) 得分图

Fig 2 Principal components analysis (PCA) score plots of *Rhizoma curcuma* samples

1-6: Sichuan *Rhizoma curcuma*; 7-11: Guangxi *Rhizoma curcuma*; 12-15: Yunnan *Rhizoma curcuma*

为了进一步明确造成不同省份药材差异的主要化学成分, 利用 SIMACA-P 软件绘制变量的载荷图 (图 3)。从图中看出保留时间为 3.38、3.59、4.01、5.34、7.19 和 11.14 min 峰的变量距离原点相对较远, 说明他们对药材的分类贡献较大。这些峰对应的化学成分依次为莪烯、 β -蒎烯、桉叶素、p-menth-1-en-8-ol、 β -榄香烯、8,9-去氢-9-甲酰基-环异长叶烯。

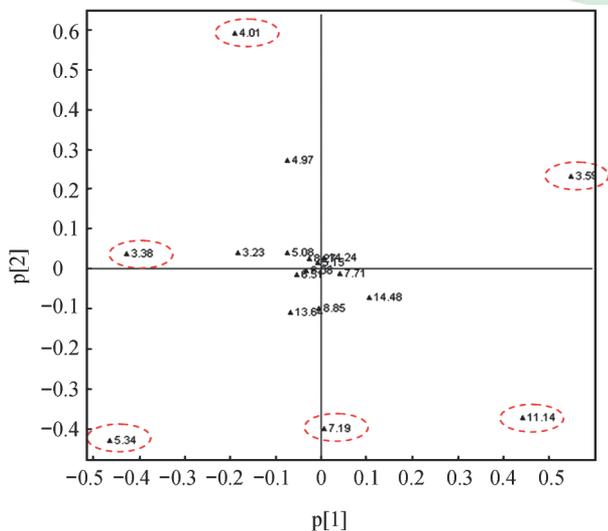


图 3 18 个共有峰的主成分分析 (PCA) 载荷图

Fig 3 Principal components analysis (PCA) loading plot of 18 common peaks

2.3 HCA 结果 使用 MATLAB 软件自编程序对上述数据矩阵进行 HCA, 采用欧氏距离计算样品间相似系数, 采用离差平方和法计算类间距离, 结果如图 4 所示。图中可见, 四川、广西和云南 3 个省份的样品各自聚为一类。HCA 将 15 批次莪术药材根据其本省的内在规律较为合理地分为 3 类, 缩小了凭借主观判断造成的误差, 使分析结果更为直观、客观。HCA 结果表明, 不同产地的莪术药材具有明显的内在差异, 相近产地的药材在化学成分上具有相似性。

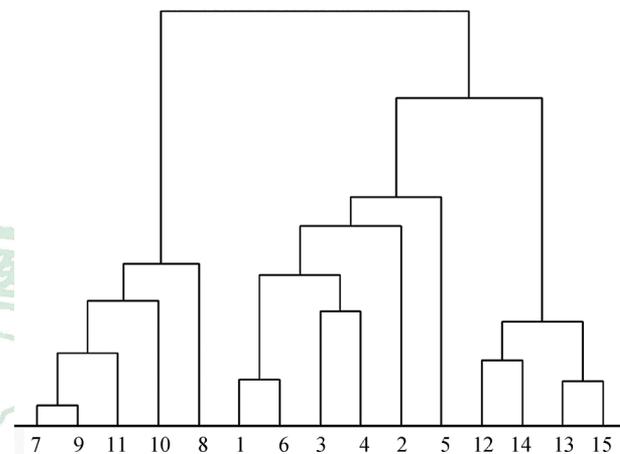


图 4 15 批次莪术药材的聚类分析结果

Fig 4 Results of hierarchical cluster analysis (HCA) from 15 batches of *Rhizoma curcuma*

1-6: Sichuan *Rhizoma curcuma*; 7-11: Guangxi *Rhizoma curcuma*; 12-15: Yunnan *Rhizoma curcuma*

3 讨论

本实验采用 HS-GC/MS 技术对不同产地莪术药材主要成分进行鉴别, 前处理简单, 无需采用有机试剂, 用品用量少, 快速准确。同时结合化学模式识别方法对不同产地莪术药材进行区分, 选取 18 个色谱峰作为 15 个样品的共有峰, 通过 NIST 05 库鉴定 18 个色谱峰相对应的化学成分, 采用 PCA 有效地区分了四川、广西和云南的莪术药材, 并明确造成不同省份药材差异的主要化学成分为莪烯、 β -蒎烯、桉叶素、p-menth-1-en-8-ol、 β -榄香烯、8,9-去氢-9-甲酰基-环异长叶烯。其中, 桉叶素在四川产莪术中含量较高, β -榄香烯在广西和云南产莪术中含量较高, β -蒎烯在广西莪术中含量较高。因此, β -榄香烯及 β -蒎烯可作为广西莪术质量控制的标准之一。HCA 结果也表明, 该方法不仅可以综合地反映相同产地

莪术药材间的相似关系,而且可以全面地反映不同产地药材间的差异。

由于仪器的灵敏度高、中药材本身含有的成分众多,HS-GC/MS获得的图谱包含了大量的成分信息,组成了一个复杂庞大的数据集。为了能够客观全面地分析图谱,避免数据缺失并取得不同来源样本的相关性和差异性,结合PCA和HCA这2种化学计量学模式识别方法,既能发现对样品的分类起主要作用的关键性成分,又能全面地反映不同产地药材之间的差异。

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:中国医药科技出版社,2010:257.

[2] Deng C H, Ji J, Li N, Yu Y J, Duan G L, Zhang X M. Fast determination of curcumol, curdione and germacrone in three species of *Curcuma rhizomes* by microwave-assisted extraction followed by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry[J]. J Chromatogr A, 2006, 1117: 115-120.

[3] Cao J, Qi M L, Fang L H, Zhou S, Fu R N, Zhang P P, et al. Solid-phase microextraction-gas chromatographic-mass spectrometric analysis of volatile compounds from *Curcuma wenyujin* Y. H. Chen et C. Ling [J]. J Pharm Biomed Anal, 2006, 40: 552-558.

[4] 郑良, 朱华勇, 沈慧, 周先礼, 赵静. GC-MS分析山东野花椒果皮中挥发油的化学成分[J]. 华西药学杂志, 2009, 24: 386-388.

[5] 王建, 赵应学. 广西莪术种内变异类型中不同颜色挥发油化学成分分析[J]. 中草药, 2009, 40: 1726-1727.

[6] 林朝展, 柴玲, 祝晨蓁, 赵钟祥, 张翠仙. 枇杷叶紫珠叶挥发油化学成分的研究[J]. 时珍国医国药, 2010, 21: 2275-2277.

[7] Yang F Q, Li S P, Chen Y, Lao S C, Wang Y T, Dong T X, et al. Identification and quantitation of eleven sesquiterpenes in three species of *Curcuma rhizomes* by pressurized liquid extraction and gas chromatography-mass spectrometry[J]. J Pharm Biomed Anal, 2005, 39: 552-558.

[8] Yang F Q, Li S P, Zhao J, Lao S C, Wang Y T. 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 Biomed Anal, 2007, 43: 73-82.

[9] Yang F Q, Wang Y T, Li S P. Simultaneous determination of 11 characteristic components in three species of *Curcuma rhizomes* using pressurized liquid extraction and high-performance liquid chromatography [J]. J Chromatogr A, 2006, 1134: 226-231.

[10] 张园, 张琦, 王贤亲. 固相萃取-气相色谱串联质谱法测定温莪术中19种有机氯和有机磷农药残留[J]. 药物分析杂志, 2012, 32: 95-99.

[11] 王青, 朱梅, 陈斌, 邢旺兴. 顶空气相色谱法测定利扎曲普坦中有机溶剂残留量[J]. 第二军医大学学报, 2004, 25: 898-899.

Wang Q, Zhu M, Chen B, Xing W X. Determination of solvent residues in rizatriptan by headspace gas chromatography[J]. Acad J Sec Mil Med Univ, 2004, 25: 898-899.

[12] 陈军辉, 谢明勇, 王远兴, 张中伟, 彭日煌, 王小如. 主成分分析法用于西洋参样品分类研究[J]. 天然产物研究与开发, 2006, 18: 193-197.

[13] 梁逸曾, 俞汝勤. 化学计量学[M]. 北京: 高等教育出版社, 2005: 203.

[本文编辑] 尹茶