

气相色谱-质谱结合化学计量学方法分析中药挥发油成分的研究进展

腾海英, 曲丽萍, 李晓林, 张明媛, 亓云鹏 (第二军医大学药学院药物分析学教研室, 上海 200433)

[摘要] 中药挥发油成分多为药效活性成分,且适合采用气相色谱-质谱分析,但是其中色谱峰重叠现象非常常见,影响了定性定量结果的准确性。利用化学计量学方法对气相色谱-质谱数据中的重叠色谱峰进行解析,有助于对挥发油中结构相似成分的分析,以提高中药材(包括药对)中挥发油成分分析的准确性。本文综述了国内外运用气相色谱-质谱结合化学计量学方法分析单味中药材和药对中挥发油成分的研究进展,并介绍了其主要研究步骤和相关化学计量学方法。

[关键词] 气相色谱-质谱;化学计量学;中药;挥发油

[中图分类号] R284 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2010)04-0245-04

气相色谱-质谱(GC-MS)是一种高效能、高选择性、高灵敏度的分析方法,尤其适合于挥发性化合物的分析。挥发油(volatile oils),又称精油,是中药中具有广泛生物活性的一类重要成分^[1,2],由于其具有挥发性,沸点一般不超过 300,故适用于气相色谱-质谱分析。

中药挥发油中所含成分一般较复杂,常常由数十种到上百种成分组成。其中,有些成分结构类似、性质相近,故色谱保留时间亦非常接近,容易产生色谱峰重叠现象,从而给挥发油成分的准确性、定量分析带来困难。化学计量学方法(chemometric resolution method, CRM)可基于色谱-光谱二维数据,对重叠色谱峰进行解析,获得其中所含成分的纯色谱和纯质谱,从而提高复杂体系分析的准确性^[3,4]。目前,将 GC-MS和化学计量学方法相结合,已成功用于不少中药(包括药对)中挥发油成分的分析,结果显示,该方法对挥发油成分分析优势明显。

1 基于色谱-光谱二维数据的化学计量学方法简介

色谱-光谱二维数据,是指 HPLC-MS、HPLC-DAD、GC-MS等联用色谱仪器产生的矩阵型数据。对色谱-光谱二维数据进行解析的化学计量学方法大致可分为迭代(iterative)和非迭代(non-iterative)算法。迭代方法需首先选定一组关键光谱,如自动窗口因子分析法(automatic window factor analysis, AWFA)^[5],初等矩阵转换(elementary matrix transformation)^[6],迭代目标转换因子分析法(iterative target transformation factor analysis, ITTFA)^[7],

交替最小二乘法(alternative least squares, ALS)^[8],正交投影法(orthogonal projection approach, OPA)^[9]等;非迭代法则采用渐进的方式,利用子窗口的信息,可解决迭代算法中遇到的真值难以收敛的问题,如直观推导式演进特征投影法(heuristic evolving atent projection, HELP)^[3,4],渐进因子分析法(evolutionary factor analysis, EFA)^[10],窗口因子分析法(window factor analysis, WFA)^[11],正交投影分辨率(orthogonal projection resolution, OPR)^[12,13],子窗口因子分析法(sub-window factor analysis, SFA)^[14],渐进窗口正交投影法(evolutionary window orthogonal projection, EWOP)^[15]和独立组分分析法(independent component analysis, ICA)^[16]等。其中,HELP已被成功用于多种中药(药对)挥发油成分的分析。

2 GC-MS和化学计量学方法相结合分析中药挥发油成分的主要步骤

2.1 挥发油成分的提取 一般可按 2005 版中国药典(一部)附录中挥发油测定的方法,即水蒸气蒸馏法提取挥发油成分,常采用二甲苯^[17]、正己烷^[18,19]等作为提取溶剂。对于热不稳定和易氧化物,可采用超临界流体萃取(supercritical fluid extraction, SFE)法,具有萃取效率高、分析时间短等特点。例如,任淑清等^[20]采用 SFE法萃取紫苏梗的挥发油成分,并与水蒸气蒸馏法的提取结果比较,发现 SFE法萃取紫苏梗挥发油有利于正构烷烃的提取,并可增加大分子物质的提取量。

2.2 GC-MS色谱条件设定 在仪器、色谱柱等条件固定的前提下,设定色谱条件时主要考虑的是程序升温条件的调整,单阶和多阶程序升温是主要采取两种方式。在中药挥发油成分的分析中,单阶程序升温^[21,22]一般以 60 为起始温度,280 为终点温度,

[基金项目] 第二军医大学“大学生创新能力培养”基金(MS2008002),国家自然科学基金(30901981)。

[作者简介] 腾海英(1988-),女,第二军医大学 2006级药学本科学员。E-mail: tenghyllove@126.com

[通讯作者] 亓云鹏。E-mail: qi Yunpeng@hotmail.com

升温速率为 4 /min;多阶程序升温(一般为二阶)适合宽沸程的试样^[18~24],如以 40 为起始温度,以 2~3 /min的升温速度升至 130 ,再以 10 /min的升温速度升至 240 。

2.3 化学计量学方法解析色谱重叠峰 对于 GC-MS产生的总离子流图中完全分离的色谱峰,可通过检索仪器自带质谱库或相关文献,及利用标准物质的保留时间信息,对其中的化合物进行结构确定。对于未完全分离的色谱峰,直接检索质谱库往往得不到明确结论,这时可采用化学计量学方法将其解析成纯色谱和质谱峰,然后再进行定性定量分析。一般来说,采用某一种化学计量学方法即可,但有时为了得到更好结果,也可采用多种方法对不同情况的重叠色谱峰进行解析^[9,25]。例如,郭方遒等^[9]。分析羌活挥发油中的色谱重叠峰,对于分离程度较好的峰簇采用 EWOP法,而对于严重重叠的峰簇则采用 OPA法,这样可以充分发挥不同解析方法的优势,避免采用单一方法时可能面临的数据不收敛或者结果不符合常规化学信息等情况^[9]。

3 具体应用

3.1 单味中药材挥发油的分析 GCMS与化学计量学方法联用已成功用于多种中药挥发油成分分析,如仙鹤草^[22]、羌活^[9,26]、鱼腥草^[27]、丁香花^[28]、玫瑰花^[29]、伊朗天竺葵^[30]、茵陈蒿^[31,32]、肉桂皮^[33,34]、荆芥^[35]、防风^[36]等。对于大叶桉叶^[17]、杜鹃^[18]、丁香^[37]等中药材,鉴定出的挥发油成分更可达到挥发油总含量的 90%以上。

HELP法是比较成熟的色谱重叠峰解析方法,也是在化学计量学方法辅助挥发油成分研究中被采用最多的方法之一。例如,李雅文等^[22]用 GCMS分析仙鹤草中的挥发油,通过主成分分析法(principle component Analysis, PCA)和固定尺寸移动窗口因子分析法(fixed size moving window evolving factor analysis, FSMWEFA)等对重叠色谱峰分别进行背景扣除和秩分析,然后采用 HELP法将重叠的色谱峰解析成纯色谱和质谱,并借助 NIST质谱库对解析得出的纯质谱进行定性鉴别,最后运用总体积分法进行定量分析。该研究从仙鹤草挥发油中共分离出 56个色谱峰,并鉴定出其中的 50个组分,主要为醇和单萜类化合物,其含量可达挥发油总含量的 90.53%。再如, Mehdi等^[30]首先采用简化 Borgen法(simplified borgen method, SBM)和 FSMWEFA等手段研究伊朗天竺葵挥发油中重叠色谱峰所含的组分数、零浓度区域和选择性区域情况,然后再采用 HELP对重叠色谱峰进行解析。通过上述化学计量

学方法的辅助,使得鉴定出的组分数由之前数据库给出的 61种增加到 85种,并根据给出的结果,证实伊朗天竺葵并不含 10表-桉油油醇成分。以上研究均采用 HELP法成功解析了 GCMS二维数据中的重叠色谱峰,并使鉴定出的组分数显著增加。

HELP方法得以应用的前提之一是重叠色谱峰中含有零浓度区域和选择性区域。因而,对于包含峰(embedded peaks),即“大峰包小峰”的情况,HELP尚无法获得满意的解析结果。因此,有些工作采用其他化学计量学方法研究挥发油中的包含色谱峰问题。例如,龚范等^[33,34]采用迭代优化步骤(iterative optimization procedure, DP)研究了肉桂皮挥发油中的包含色谱峰,并结合 HELP、OPR、SFA等方法对重叠色谱峰进行了解析,最终鉴定出 4个不同产地的肉桂皮挥发油中的 60多种组分,占挥发油含量的 92%以上,该结果也表明这些化学计量学方法提高了定性定量分析的准确性。另外,在运用 HELP法进行解析时通常针对的是某一个样品,即直接将其中的重叠色谱峰解析为纯色谱和纯质谱。近年来,又发展了交互移动窗口因子分析法(alternative moving window factor analysis, AMWFA)等新方法,可对多个样品中相应保留时间处的重叠色谱峰同时进行解析,故特别适合于中药指纹图谱研究。例如,易伦朝等^[21]采用 AMWFA法分析了 3种不同植物来源的陈皮挥发油成分,并对 3种样品中处于相应保留时间处的重叠色谱峰进行交互解析,对其中包含的组分进行了定性鉴别;最终,共分辨出 138个峰,鉴别出 78个峰,其中包括 44个三者均含有的共有峰。Zeng等^[38]也运用 AMWFA法分析了铁线莲中的 86种挥发性成分,占总挥发油含量的 96.5%,结果表明铁线莲的主要挥发性成分为 *n*棕榈酸和 (Z, Z)-9, 12-十二碳二烯酸。

3.2 药对中挥发油的分析 药对具有中药配伍的基本特点,是从单味药到复方的桥梁。药对在煎煮时发生了复杂的氧化、还原、缩合、水解等化学反应和增溶作用等物理变化,使得某些在单味药中含量较高的成分,在药对中的含量会减少甚至消失,而某些成分在药对中的含量则可能增加。通过研究药对,可为中药复方的配伍研究提供重要依据。目前,GCMS和化学计量学方法相结合,已成功应用于桃仁红花^[19]、川芎羌活^[23]、麻黄羌活^[24]、川芎赤芍^[39]、麻黄桂枝^[40]、桂枝羌活^[41]等药对的研究。

中药配伍为我国传统的用药方式,因而国外鲜有针对药对中挥发油分析的报道;在已见报道的国内文献中,所采用的化学计量学也主要是 HELP法。例如,李国辉等^[24]用 GCMS和 HELP方法研究了

麻黄、羌活单味药材及麻黄 羌活药对的挥发油成分,发现在麻黄 羌活药对的挥发油成分中,有 40种来自羌活,13种来自麻黄;另外,还从麻黄 羌活药对的挥发油中发现了苡烯、3-亚甲基-6-(1-甲基乙基)环己烯等 10种麻黄和羌活药材均不含有的新化合物。由此可见,药对中的成分较单味药更复杂,药对中各单味药之间在煎煮过程可能发生了物理变化或其他反应,因而出现了新的化合物。

又如,李晓如等^[19]用 GC-MS和化学计量学方法研究桃仁 红花药对的挥发油成分,发现桃仁、红花药材和桃仁 红花药对的挥发油成分存在较大差别,从中分别鉴定得到 27、52和 84个化合物,分别占相应挥发油总含量的 89.43%、94.37%和 92.06%。药对在煎煮时由于增溶作用,单味药中的某些化学成分的溶出速率有所提高,如红花中的 2,2,5-甲基-3,4-己二酮、*n*-十碳酸,桃仁中的 2-戊基-咪喃,红花和桃仁均含有的 2,3-己二酮等在合煎时溶出率有所提高,挥发油成分也有显著提高;同时,煎煮后也可能出现一些新的活性成分,如在桃仁 红花药对挥发油中发现了甲基丙烯酸酐、壬烷、3,3-二甲基-庚烷、乙基-苯乙醇、6,10,14-三甲基-2-十五碳酮等桃仁、红花药材中均不含有的新化合物。

4 结语

中药挥发油组成复杂,其中的重叠色谱峰也已成为实际工作中亟待解决的问题。由上可见,将 GC-MS手段和化学计量学方法相结合,已在中药挥发油成分研究中获得了成功应用;通过这种新途径,可以对中药(药对)中的重叠色谱峰进行解析,获得其中包含组分的纯色谱和纯质谱的信息,从而可对中药(药对)的挥发油成分进行准确鉴别和定量,并有助于阐明药对中相关成分的变化规律。同时,在化学计量学方法学研究方面,针对不同的色谱峰重叠情况,也已逐渐发展了 HELP, AMW FA 等化学计量学方法,并在中药挥发油分析中取得了预期效果,同时为中药现代化研究提供了一条新途径。

【参考文献】

- [1] 徐惠波,孙晓波,赵全成,等.羌活挥发油的药理作用研究[J].中草药,1991,22(1):28
- [2] 郑虎占,董泽宏,余靖.中药现代研究与应用(第4卷)[M].北京:学苑出版社,1999:3010
- [3] Kvalheim OM, Liang YZ. Heuristic evolving latent projections-resolving 2-way multicomponent data. 1. Selectivity, latent-projective graph, datascope, local rank and unique resolution[J]. Anal Chem, 1992, 64(8): 936
- [4] Liang YZ, Kvalheim OM, Keller HR, et al. Heuristic evolving latent projections-resolving 2-way multicomponent data. 2. Detection and resolution of minor constituents[J]. Anal Chem, 1992, 64(8): 946
- [5] Malinowski ER. Automatic window factor analysis: A more efficient method for determining concentration profiles from evolutionary spectra[J]. J Chemom, 1996, 10(4): 273
- [6] Manne R, Grande BV. Resolution of two-way data from hyphenated chromatography by means of elementary matrix transformations[J]. Chemom Intell Lab Syst, 2000, 50(1): 35
- [7] Vandeginste BGM, Derks W, Kateman G. Multicomponent self-modelling curve resolution in high-performance liquid chromatography by iterative target transformation analysis[J]. Ana Chim Acta, 1985, 173: 253
- [8] Tauler R, Casassas E. Spectroscopic resolution of macromolecular complexes using factor analysis: Cu(II)-polyethyleneimine system[J]. Chemom Intell Lab Syst, 1992, 14(1): 305
- [9] 郭方道,梁逸曾,黄兰芳,等. GC-MS与正交投影法或渐进窗口正交投影法用于羌活挥发油成分的测定[J]. 高等学校化学学报, 2004, 25(3): 430
- [10] Maeder M. Evolving factor analysis for the resolution of overlapping chromatographic peaks[J]. Anal Chem, 1987, 59(3): 527
- [11] Malinowski ER. Window factor analysis: Theoretical derivation and application to flow injection analysis data[J]. J Chemom, 1992, 6(1): 29
- [12] Sanchez FC, Rutan SC, Garcia MDG, et al. Resolution of multicomponent overlapped peaks by the orthogonal projection approach, evolving factor analysis and window factor analysis[J]. Chemom Intell Lab Syst, 1997, 36(2): 53
- [13] Liang YZ, Kvalheim OM. Diagnosis and resolution of multivariate chromatograms by rank map, orthogonal projections and sequential rank analysis[J]. Anal Chim Acta, 1994, 292(1-2): 5
- [14] Manne R, Shen H, Liang YZ. Local resolution of hyphenated chromatographic data[J]. Chemom Intell Lab Syst, 1999, 45(1-2): 171
- [15] Xu CJ, Jiang JH, Liang YZ. Evolving window orthogonal projections method for two-way data resolution[J]. Analyst, 1999, 124: 1471
- [16] Comon P. Independent component analysis, A new concept. Signal Process [J]. 1994, 36, 287
- [17] 唐伟军,周菊峰,李晓宁,等.大叶桉叶挥发油的化学成分研究[J].分析科学学报,2006,22(2):182
- [18] 赵晨曦,梁逸曾,李晓宁,等.杜鹃嫩枝叶挥发油化学成分研究[J].药学学报,2005,40(9):854
- [19] 李晓如,梁逸曾,郭方道,等.气相色谱/质谱化学计量学方法测定药对桃仁 红花挥发油[J].分析化学,2007,35(4):532
- [20] 任淑清,孙长海,方洪壮,等.紫苏梗挥发油的 GC-MS定性分析[J].中国药房,2008,19(9):683
- [21] 易伦朝,梁逸曾,曾仲大,等. GC-MS与交互移动窗口因子分析法(AMW FA)用于3种陈皮挥发油成分的比较分析[J].高等学校化学学报,2006,27(9):1626
- [22] 李雅文,黄兰芳,梁晟,等.仙鹤草挥发油化学成分的气相色谱/质谱分析[J].中南大学学报(自然科学版),2007,38(3):502

结果发现对照品溶液与样品溶液先后进针得出腺苷主峰保留时间有明显差异,而且理论板数有很大差别,调节流动相配比使腺苷主峰保留时间延长至 24 min,发现样品与对照品腺苷主峰出峰时间相差近 1 min,这明显不合理,用加标溶液进针,发现主峰变形不对称,说明主峰位置受到杂质干扰,按本实验使用的色谱柱以甲醇作有机相无法有效分离。改用乙腈作有机相,结果基线稳定,峰形相对较好,主峰保留时间为 6.5 min,样品主成分峰与杂质峰达到基线分离,理论板数按腺苷峰计算为 4 800,与对照品的 5 000理论板数相近。

3.2 取样量 采用 0.5、1、2 g样品量做比较,加样回收取半量,结果表明随着取样量增大,回收率越低,这是因为软胶囊中的植物油与提取液乳化的造

成的影响。实验证明取样量不大于 0.5 g,腺苷能完全提取,回收效果让人满意。

3.3 定量方法 按外标法计算(批号 20090603)折回收率后为 61.75 mg/100 g,按标准曲线计算为 61.66 mg/100 g,两种方法的 RAD 为 0.08%,两者无明显差异,因此采用外标法定量。

【参考文献】

- [1] 中国药典 2005版.一部[S]. 2005: 75.
- [2] 中华人民共和国卫生部.保健食品检验与评价技术规范[S]. 2003: 300.

[收稿日期] 2009-11-30

[修回日期] 2010-03-18

(上接第 247页)

- [23] 李晓如,赵君,兰正刚,等.药对川芎羌活挥发油的气质联用分析与化学计量学解析[J].中南大学学报, 2007, 38(4): 681.
- [24] 李国辉,李晓如,邹桥,等.采用气相色谱-质谱法分析药对麻黄羌活的挥发油[J].中南大学学报(自然科学版), 2007, 38(5): 888.
- [25] Mehdi JH, Behrooz Z, Hassan S. Use of gas chromatography-mass spectrometry combined with resolution methods to characterize the essential oil components of Iranian cumin and caraway[J]. Journal Chromatogr A, 2007, 1143(1-2): 5.
- [26] 李国辉,曾笑,张斌,等.气相色谱-质谱法分析羌活挥发油成分[J].现代中药研究与实践, 2007, 21(6): 19.
- [27] Xu CJ, Liang YZ, Chau FT. Identification of essential components of Houttuynia cordata by gas chromatography/mass spectrometry and the integrated chemometric approach[J]. Talanta, 2005, 68(1): 108.
- [28] Zhao CX, Liang YZ, Fang HZ, et al. Temperature-programmed retention indices for gas chromatography-mass spectroscopy analysis of plant essential oils[J]. Journal Chromatogr A, 2005, 1096(1-2): 76.
- [29] Mehdi JH, Hadi P, Hassan S. Development of a method for analysis of Iranian damask rose oil: Combination of gas chromatography-mass spectrometry with Chemometric techniques[J]. Anal Chim Acta, 2008, 623(1): 11.
- [30] Mehdi JH, Behrooz Z, Hassan S. Characterization of essential oil components of Iranian geranium oil using gas chromatography-mass spectrometry combined with chemometric resolution techniques[J]. Journal Chromatogr A, 2006, 1114(1): 154.
- [31] Guo FQ, Liang YZ, Xu CJ, et al. Analyzing of the volatile chemical constituents in Artemisia capillaris herba by GC-MS and correlative chemometric resolution methods[J]. Journal Pharma Biomed Anal, 2004, 35(3): 469.

- [32] Guo FQ, Liang YZ, Xu CJ, et al. Comparison of the volatile constituents of Artemisia capillaris from different locations by gas chromatography-mass spectrometry and projection method[J]. Journal Chromatogr A, 2004, 1054(1-2): 73.
- [33] Gong F, Liang YZ, Xu QS, et al. Gas chromatography-mass spectrometry and chemometric resolution applied to the determination of essential oils in Cortex Cinnamomi[J]. Journal Chromatogr A, 2001, 905(1-2): 193.
- [34] Gong F, Liang YZ, Fung YS. Analysis of volatile components from Cortex cinnamomi with hyphenated chromatography and chemometric resolution[J]. Journal Pharma Biomed Anal, 2004, 34(5): 1029.
- [35] 陈勇,李晓如,曾笑,等.荆芥挥发油成分的气相色谱-质谱分析[J].世界科技研究与发展, 2007, 29(4): 43.
- [36] 陈勇,李晓如,曾笑,等.气相色谱-质谱和化学计量学解析法分析防风挥发油成分[J].中国医院药学杂志, 2008, 28(6): 500.
- [37] 赵晨曦,梁逸曾,李晓宁.丁香挥发油化学成分与抗菌活性研究[J].天然产物研究与开发, 2006, 18(3): 381.
- [38] Zeng YZ, Zhao CX, Liang YZ, et al. Comparative analysis of volatile components from Clematis species growing in China[J]. Anal Chim Acta, 2007, 595(1-2): 328.
- [39] 李晓如,梁逸曾,杨辉,等.中药药对的化学成分研究——川芎赤芍挥发油的 GC-MS 分析[J].高等学校化学学报, 2006, 27(3): 443.
- [40] 李晓如,梁逸曾,李晓宁.气相色谱-质谱和化学计量学解析法分析药对麻黄桂枝挥发油成分[J].药学报, 2007, 42(2): 187.
- [41] 李国辉,李晓如,刘少印.药对桂枝羌活挥发油成分分析[J].亚太传统医药, 2008, 4(7): 15.

[收稿日期] 2009-10-10

[修回日期] 2009-10-29