

· 论著 ·

顶空气相色谱-质谱联用技术结合保留指数鉴别猫人参中的挥发性成分

李玲¹, 吕磊², 董昕¹, 吕狄亚¹, 徐立³ (1. 第二军医大学药学院分析测试中心, 上海 200433; 2. 东方肝胆外科医院药材科, 上海 200438; 3. 解放军 113 医院药械科, 浙江 宁波 315040)

[摘要] 目的 分析中药猫人参的挥发性成分。方法 采用顶空气相色谱-质谱联用技术(HS-GC-MS),并结合保留指数对其挥发性成分进行定性定量分析。结果 共分离出猫人参中 42 种挥发性成分,鉴别出其中的 25 种,主要包括醇类、醛类、脂类和烃类等。结论 结合保留指数的计算,提高了 HS-GC-MS 定性的准确性,该方法可为猫人参资源合理开发利用提供依据。

[关键词] 猫人参;顶空气相色谱-质谱联用;保留指数;挥发性成分

[中图分类号] R927 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2016)01-0052-04

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2016.01.014

Analysis of volatile components from *Actinidia valvata* by HS-GC-MS based on retention index

LI Ling¹, LÜ Lei², DONG Xin¹, LÜ Diya¹, XU Li³ (1. Pharmaceutical Analysis Center, School of Pharmacy, Second Military Medical University of PLA, Shanghai 200433, China; 2. Department of Pharmacy, Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, Shanghai 200438, China; 3. Department of Medicinal Instrument, No. 113 Hospital of PLA, Ningbo 315040, China)

[Abstract] **Objective** To establish a method for determining volatile components from *Actinidia valvata* Dunn. **Methods** A static headspace-gas chromatography-mass spectrometry (HS-GC-MS) method was used to analyze volatile components, and the separated peaks were identified by mass spectral library searching combined with retention index comparison. **Results** 42 volatile components were separated from *Actinidia valvata* Dunn and 25 of them were identified, mainly including alcohols, esters, aldehydes, hydrocarbons and so on. **Conclusion** Combined with retention index calculation, this method improved accuracy of qualification of HS-GC-MS and provided scientific proof for the exploitation and utilization of *Actinidia valvata* Dunn.

[Key words] *Actinidia valvata*; HS-GC-MS; retention index; volatile components

猫人参为猕猴桃科植物对萼猕猴桃(*Actinidia valvata* Dunn)的干燥根,是江浙一带常用的民间中药材,其味苦涩,性凉,具有清热解毒之功效,临床上常用于治疗肝癌、肺癌及消化道肿瘤等^[1,2]。猫人参的药理作用已得到临床验证,但目前对于其化学成分的研究并不多,笔者采用顶空气相色谱-质谱联用(HS-GC-MS)技术对猫人参中低极性的挥发性组分进行定性分析,在利用 NIST 数据库检索的基础上,结合保留指数对化合物进行定性,提高定性分析的准确性^[3],明确了猫人参的化学成分,并利用峰面积归一化法计算得到猫人参的挥发性成分的含量,为其药理药效的深入研究和资源的合理开发利用提

供依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器 气相色谱 Thermo Trace GC Ultra;质谱 Thermo DSQII;顶空自动进样器 Thermo Triplus HS(美国赛默飞世尔公司);Xcalibur 工作站;METTLER AE240 型电子天平(瑞士梅特勒公司);LX-02 药材粉碎机(上海利祥公司)。

1.2 材料 药材猫人参(产地:安徽,批号:20130801)购自上海雷允上大药房,经第二军医大学药学院生药教研室黄宝康教授鉴定确为猕猴桃科植物对萼猕猴桃的干燥根;正构烷烃混合对照品:C₈~C₂₀,40 mg/L 溶于正己烷(批号:101334729),β-石竹烯对照品(批号:101278589,含量:98.5%),肉豆蔻醚对照品(批号:101330679,含量:98.5%),对照品均购于 Sigma 公司;正己烷为分析纯,购于国药试剂公司。

[作者简介] 李玲,硕士,实验师.研究方向:药物质量标准研究. E-mail:316262150@163.com

[通讯作者] 徐立,本科,主任药师.研究方向:药物质量控制研究. E-mail:995399106@qq.com

2 方法与结果

2.1 样品的制备 取粉碎后的猫人参药材 0.5 g, 精密称定, 置 10 ml 顶空进样瓶中, 用聚四氟乙烯瓶盖密封; 另取 30 μ l 的正构烷烃对照品置于 10 ml 顶空瓶中, 密封。

2.2 色谱质谱条件 色谱柱选用 Agilent HP-5MS (30 m \times 0.25 mm, 0.25 μ m); 分流比为 10 : 1; 进样口温度为 200 $^{\circ}$ C; 选择线性程序升温方式; 起始温度为 40 $^{\circ}$ C, 以 6 $^{\circ}$ C/min 的速率升至 230 $^{\circ}$ C, 保持 3 min; 传输线温度 250 $^{\circ}$ C; 载气为高纯氦气, 流速为 1.0 ml/min; 孵化箱温度 140 $^{\circ}$ C, 孵化时间 50 min; 进样针温度 145 $^{\circ}$ C, 进样体积 1.0 ml; 质谱离子源为 EI 源, 电子能量 70 eV, 离子源温度 250 $^{\circ}$ C; 扫描范围 (m/z): 30~350。

2.3 保留指数的测定 保留指数 (retention index, RI) 是气相色谱定性的重要参数^[4], 1963 年 Vanden 等^[5] 定义了线性程序升温的保留指数, 其公式为: $I_{TP} = 100n + 100[T_x - T_n] / [T_{n+1} - T_n]$, 式中 T 代表保留温度, x 表示待测化合物, n 和 $n+1$ 分别表示待测物保留时间前后正构烷烃的碳原子数。由于保留温度和保留时间通常具有高度的相关性, 对于单一的线性程序升温, 可以用保留时间 t 代替上式中的保留温度 T 来计算待测化合物的保留指数^[6,7]。

2.4 结合保留指数对化合物的鉴别及准确性验证 猫人参的挥发性成分组成复杂, 采用保留指数进行鉴别, 相比普通的库搜索具有一定的优势, 下面以肉豆蔻醚为例说明保留指数的鉴别过程。总离子流图中保留时间为 20.68 min 的峰, 该峰前后的正构烷烃的保留时间分别为 20.27 min 和 22.28 min, 根据线性程序升温条件下的保留指数计算公式, 计算出 20.68 min 处峰的保留指数为 1 523, 通过 NIST 数据库 Search 2.0 检索, 在 HP-5MS 柱、线性程序升温条件下查询匹配度最高的前 10 个化合物的保留指数, 结果最为接近的是 Myristicin (肉豆蔻醚), 其保留指数为 1 520, 这一结果与已发表的文献一致^[8]。

为了进一步验证保留指数定性结果的准确性, 我们将肉豆蔻醚对照品用正己烷溶解稀释配制成约 50 μ g/ml 的对照品溶液, 按照“2.2”项下的色谱质谱条件进样分析, 结果如图 1 所示, 肉豆蔻醚保留时间为 20.67 min, 质谱碎片信息与样品中 20.68 min 处的碎片信息基本一致, 表明通过保留指数的计算, 并与谱库中相应条件下的保留指数比对来进行化合

物的鉴别, 结果可靠。

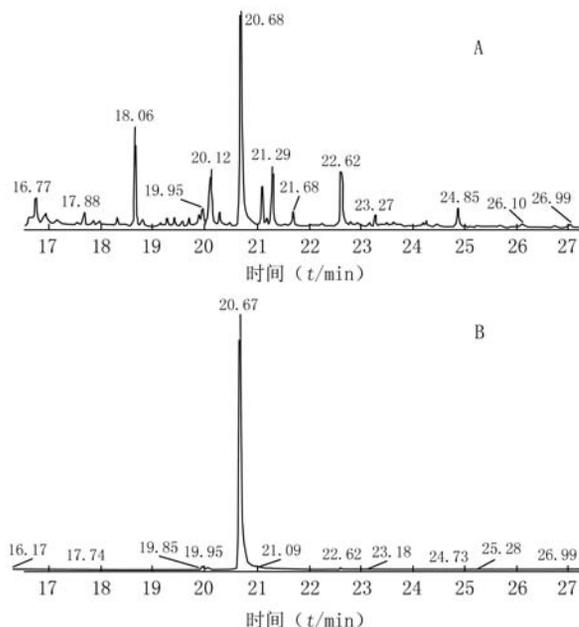


图 1 样品(A)和对照品(B)肉豆蔻醚的 GC-MS 总离子流图

2.5 猫人参挥发性成分鉴别结果 按上述实验条件分别将正构烷烃及猫人参样品注入气相色谱仪进行分离分析, 30 min 得到正构烷烃及猫人参挥发性成分的总离子流图, 如图 2 和图 3 所示。根据正构烷烃和猫人参样品中各组分的保留时间, 计算各化合物的 I_{TP} , 通过检索 NIST 数据库, 选取质谱匹配度最高的前 10 个可能的化合物, 将计算的 I_{TP} 值与 NIST 库检索结果相比较, 以质谱图、 I_{TP} 与 I 匹配度最高的化学结构为最佳鉴定结果。按照该鉴别方法, 并结合参考文献^[9-11], 总共分离出 42 种挥发性成分, 鉴别出其中的 25 种。将分离得到的所有组分的全部色谱峰面积作为 100%, 通过面积归一化法计算得出各成分的相对百分含量, 结果如表 1 所示。

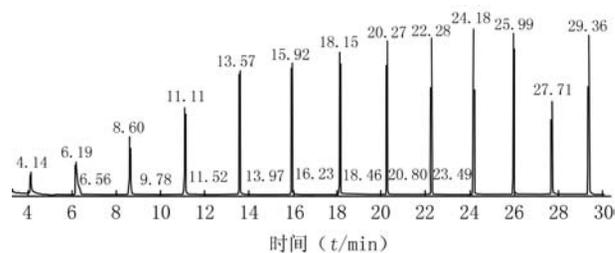


图 2 正构烷烃 C₈~C₂₀ 的 GC-MS 总离子流图

3 讨论

3.1 顶空分析条件的优化 顶空进样前, 样品必须在一定温度条件下孵化, 当样品瓶中的两相达到平

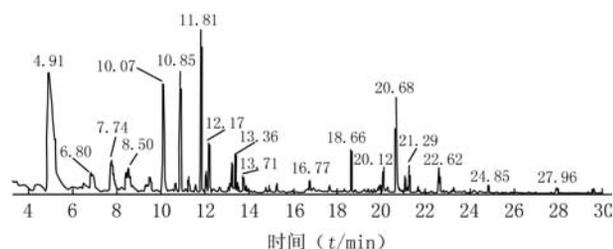


图3 猫人参 GC-MS 总离子流图

衡时才能进入气相色谱测定。本实验考察了不同平衡温度对于挥发性组分鉴别的影响,通过查阅文献^[12,13],一般平衡的时间不低于 30 min,因此我们先用 30 min 的平衡时间分别考察了 110、120、130、140、145 °C 的平衡温度,结果发现当平衡温度达到 140 °C 时,化合物出峰的数目基本稳定,因此我们选择 140 °C 作为猫人参顶空进样分析的平衡温度。之后在此温度下我们又对顶空进样的平衡时间进行优

表1 猫人参挥发性成分鉴别结果

序号	保留时间 (t_{R}/min)	化合物名称	分子式	相对分子质量 (M_r)	计算保留指数 (I_{TP})	查询保留指数 (I)	百分含量 (%)
1	4.91	furfural	$C_5H_4O_2$	96	828	831	9.57
2	6.80	artemisia triene	$C_{10}H_{16}$	136	925	922	1.22
3	7.74	5-methyl furfura	$C_6H_6O_2$	110	964	966	2.16
4	8.50	3-butyl-cyclohexene	$C_{10}H_{18}O$	154	996	995	1.42
5	10.07	3,6-dimethyl-2,3,3a,4,5,7a-hexahydro-benzofuran	$C_{10}H_{16}O$	152	1161	1168	8.22
6	10.85	5-methyl-3-(1-methylethyl ethylidene)-4-hexen-2-one	$C_{10}H_{16}O$	152	1090	1099	9.45
7	11.24	nonanal	$C_9H_{18}O$	142	1105	1106	1.14
8	11.55	5-methyl-2-(1-methylethyl)-2-cyclohexen-1-one	$C_{10}H_{16}O$	152	1118	...	14.78
9	11.81	2-ethylidene-6-methyl-3,5-heptadienal	$C_{10}H_{14}O$	150	1128	1128	2.08
10	12.03	2-isopropylidene-5-methylhex-4-enal	$C_{10}H_{16}O$	152	1137	...	1.61
11	12.17	1,3,4-trimethyl-3-cyclohexene carboxaldehyde	$C_{10}H_{16}O$	152	1143	1136	4.86
12	13.14	(R)-4-methyl-1-(1-methylethyl)-3-cyclohexen-1-ol	$C_{10}H_{18}O$	154	1183	1182	0.89
13	13.21	2,2,4-trimethyl-3-cyclohexene-1-carbaldehyde	$C_{10}H_{16}O$	152	1185	1175	2.12
14	13.36	β -cyclocitral	$C_{10}H_{16}O$	152	1191	1204	2.94
15	13.47	2,3-dihydro-2,2,6-trimethyl benzal-hyde	$C_{10}H_{14}O$	150	1196	1202	0.73
16	13.71	decanal	$C_{10}H_{20}O$	156	1206	1206	1.26
17	17.68	copaene	$C_{15}H_{24}$	204	1379	1375	0.49
18	18.66	β -caryophyllene	$C_{15}H_{24}$	192	1418	1420	3.45
19	20.12	β -eudesmene	$C_{15}H_{24}$	204	1493	1493	1.9
20	20.68	myristicin	$C_{11}H_{12}O_3$	192	1520	1523	7.37
21	21.09	eudesma-3,7(11)-diene	$C_{15}H_{24}$	204	1541	1545	1.31
22	21.29	7-ethynyl-1,4a-dimethyl-4a,5,6,7,8,8a-hexahydro-2(1H)-naphthalenone	$C_{12}H_{14}O_4$	222	1551	1548	2.04
23	21.68	β -vatiorenene	$C_{15}H_{24}O$	220	1570	...	0.56
24	22.62	dillapiole	$C_{15}H_{18}$	198	1618	1621	1.89
25	24.85	aristol-9-en-8-one	$C_{15}H_{22}O$	218	1737	1745	0.94

注: I_{TP} 为通过线性保留指数计算公式计算得到的保留指数结果; I 为通过 NIST 查询得到的各化合物的保留指数结果

化,分别考察了 30、40、50、60 min 的平衡时间,随机选取了其中的 10 个峰,考察了各峰的峰面积,结果显示,50 min 前随着时间的增加,各峰的峰面积在逐渐增加,50 min 后峰面积增加不明显,到 60 min 时,出峰时间较早的峰面积略有下降,因此我们选择 50 min 作为平衡时间。

3.2 保留指数在同分异构体鉴别中的优势 虽然 GC-MS 一般都配有化合物数据库,但在遇到同分异构体、同系物或者其他碎片结构非常相似的化合物时,直接检索 NIST 数据库很难得到准确的结果。通过保留指数的计算,结合数据库的匹配,有助于部分同分异构体的判别^[14,15]。例如,保留时间为 18.66 min 的峰,通过直接谱库检索发现前 3 个化合

物匹配的分子式均为 $C_{15}H_{24}$,且匹配度都大于 900,而通过保留指数计算,该峰的保留指数为 1420,经查询,前 3 个化合物在 HP-5MS 柱、线性程序升温条件下的保留指数分别为 1418(β -caryophyllene)、1402(isocaryophyllene)、1442(4,11,11-trimethyl-8-methylene-bicyclo[7,2,0]undec-4-ene)。因此我们认为 18.66 min 处的峰为 β -caryophyllene(β -石竹烯)。为了验证这一结论,我们将 β -石竹烯对照品配制成约 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的正己烷溶液,按照“2.2”项下的色谱质谱条件进样分析,结果两者保留时间相同且碎片信息基本一致。因此,我们认为 GC-MS 数据库检索结合保留指数对化合物进行鉴别,特别是对于同分异构体、同系物的判别,其结果更加可靠。

4 小结

笔者运用 HS-GC-MS 技术分析,总共分离出猫人参中的 42 种挥发性成分,鉴定了其中的 25 种,主要包括醇类、醛类、脂类和烃类等。静态顶空进样方法简单快速,不需要添加任何溶剂,从而减少了溶剂的干扰和杂质的引入。结合保留指数的计算弥补了常规 GC-MS 谱库检索定性方法的不足,使得鉴别结果更加准确可靠。该研究为猫人参的进一步深入研究和资源的合理开发利用提供了依据。

【参考文献】

[1] 陈豪,潘坤官,何丽君. 抗癌中药猫人参研究概况[J]. 海峡药学, 2011, 23(12):9-11.
[2] 徐一新,项昭保,陈晓晶,等. 中药猫人参中的抗肿瘤活性成分[J]. 第二军医大学学报, 2011, 32(7):749-753.
[3] Federica B, Maria C, Alessandro M, et al. Retention indices in the analysis of food aroma volatile compounds in temperature programmed gas chromatography: database creation and evaluation of precision and robustness[J]. J Sep Sci, 2007, 30(4): 563-572.
[4] 李浩春. 分析化学手册[M]. 2版. 北京: 化学工业出版社, 1999:46.
[5] Vanden D, Kratz PD. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography[J]. J Chromatogr, 1963, 11: 463-

471.
[6] 梁晟,李雅文,赵晨曦,等. GC-MS 结合保留指数对中药挥发油的定性[J]. 分析测试学报, 2008, 27(1): 84-87.
[7] 王坚,陈鸿平,刘友平,等. Kováts 保留指数在中药挥发油成分定性中的作用-青皮[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(14):92-96.
[8] 陈艳. 肉豆蔻精油挥发性组分色谱保留指数的预测[J]. 食品科学, 2011, 32(12):274-277.
[9] 辛海量,徐燕丰,吴迎春,等. 猫人参化学成分的气相色谱-质谱联用分析[J]. 时珍国医国药, 2009, 20(6): 1299-1300.
[10] 袁珂,朱建鑫,张耀,等. 猫人参化学成分研究[J]. 中草药, 2008, 39(4):505-507.
[11] 丁丽丽,王顺春,王峥涛. 猫人参化学成分的研究[J]. 中国中药杂志, 2007, 32(18):1893-1895.
[12] 谢显珍,王玉林,朱丹晖,等. 气相色谱-质谱联用结合保留指数分析仙鹤草挥发性成分[J]. 分析科学学报, 2013, 29(5): 651-654.
[13] 刘永波,赵慎晃,薛瑞芳. 顶空-气相色谱-质谱联用法测定水和废水中 8 种苯系物[J]. 环境监测管理与技术, 2012, 24(1): 43-46.
[14] 苏越,姬厚伟,苏式兵,等. GC-MS 中保留指数和保留温度回归分析应用于单萜烯结构确认[J]. 分析测试技术与仪器, 2008, 14(3): 131-135.
[15] 苏越,刘素红,王呈仲,等. 谱图相似度分析结合保留指数对单萜烯同分异构体的 GC-MS 定性分析[J]. 分析测试学报, 2009, 28(5): 525-528.

【收稿日期】 2014-10-29 【修回日期】 2015-03-08
【本文编辑】 顾文华

(上接第 4 页)

(selective estrogen receptor modulators). The influence of different metal units on breast cancer cell antiproliferative effects[J]. Dalton Trans, 2006, 4: 529-541.
[21] Li M J, Greenblatt HM, Dym O, et al. Structure of estradiol metal chelate and estrogen receptor complex: The basis for designing a new class of selective estrogen receptor modulators[J]. J Med Chem, 2011, 54(10): 3575-3580.
[22] Top S, Vessires A, Leclercq G, et al. Synthesis, biochemical properties and molecular modelling studies of organometallic specific estrogen receptor modulators (SERMs), the ferrocifens and hydroxyferrocifens: evidence for an antiproliferative effect of hydroxyferrocifens on both hormone-dependent and hormone-independent breast cancer cell lines[J]. Chemistry, 2003, 9(21): 5223-5236.
[23] Plazuk D, Vessires A, Hillard EA, et al. A [3]ferrocenophane polyphenol showing a remarkable antiproliferative activity on breast and prostate cancer cell lines[J]. J Med Chem, 2009, 52(15): 4964-4967.
[24] Jain N, Kanojia RM, Xu J, et al. Novelchromene-derived selective estrogen receptor modulators useful for alleviating hot flashes and vaginal dryness[J]. J Med Chem, 2006, 49(11): 3056-3059.

[25] Jain N, Xu J, Kanojia RM, et al. Identification and structure-activity relationships of chromene-derived selective estrogen receptor modulators for treatment of postmenopausal symptoms[J]. J Med Chem, 2009, 52: 7544-7569.
[26] Paterni I, Granchi C, Katzenellenbogen JA, et al. Estrogen receptors alpha (ER α) and beta (ER β): subtype-selective ligands and clinical potential[J]. Steroids, 2014, 90: 13-29.
[27] Kim S, Wu JY, Birzin ET, et al. Estrogen Receptor Ligands. II. Discovery of benzoxathiins as potent, selective estrogen receptor modulators[J]. J Med Chem, 2004, 47(9): 2171-2175.
[28] Liao ZQ, Dong C, Carlson KE, et al. Triaryl-substituted-schiff bases are high-affinity subtype-selective ligands for the estrogen receptor[J]. J Med Chem, 2014, 57: 3532-3545.
[29] Carroll VM, Jeyakumar M, Carlson KE, et al. Diarylpropionitrile (DPN) enantiomers: synthesis and evaluation of estrogen receptor β -selective ligands[J]. J Med Chem, 2012, 55: 528-537.
[30] Ohta K, Ogawa T, Kaise A, et al. Aliphatic substitution of ocarboranyl phenols enhances estrogen receptor beta selectivity[J]. Chem Pharm Bull, 2014, 62: 386-391.

【收稿日期】 2014-10-13 【修回日期】 2015-06-05
【本文编辑】 顾文华