

SPME-GC-MS 法研究竹叶柴胡和北柴胡挥发性成分差异

王砚^{1,2}, 王书林^{1*}

(1. 成都中医药大学药学院, 成都 611137; 2. 四川省食品药品检验检测院, 成都 611731)

[摘要] 目的:对竹叶柴胡和北柴胡进行挥发性成分的比较和分析,指出竹叶柴胡和北柴胡的差异性和共同性。方法:利用固相微萃取技术(SPME)提取,采用气质联用(GC-MS)进行分离和鉴定。结果:共鉴定出竹叶柴胡48个成分,北柴胡21个成分,其中有10个化合物为共有峰,相对质量分数最高的均为 *n*-十六烷酸。结论:SPME-GC-MS能全面快速分析柴胡挥发油成分,并作为柴胡药材质量评估和基源鉴定的科学手段。

[关键词] 竹叶柴胡; 北柴胡; 挥发油; 固相微萃取-气质联用; *n*-十六烷酸

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)14-0104-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014140104

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20140528.1332.013.html>

[网络出版时间] 2014-05-28 13:32

Different Analysis of Essential Oil from *Bupleurum marginatum* and *Bupleurum chinese* by SPME-GC-MS

WANG Yan^{1,2}, WANG Shu-lin^{1*}

(1. Pharmacy College of Chengdu University of Chinese Traditional Medicine, Chengdu 611137, China;
2. Sichuan Provincial Institute for Food and Drug Control, Chengdu 611731, China)

[Abstract] **Objective:** To find the difference and the identity through analyzing the essential oil of *Bupleurum marginatum* and *B. chinese*. **Method:** The essential oil components of *B. marginatum* and *B. chinese* were extracted by solid phase micro extraction (SPME) and analyzed by GC-MS. **Result:** Forty-eight compounds were identified from *B. marginatum*. and 21 from *B. Chinese*. Ten common compounds were found and *n*-hexadecanoic acid was the main compound of highest relative content in both of *B. marginatum* and *B. chinense*. **Conclusion:** The information about the constituents of essential oil can be obtained entirely and quickly by SPME-GC-MS which is the scientific method of quality assessment and origin identification.

[Key words] *Bupleurum marginatum*; *Bupleurum chinese*; essential oil; SPME-GD-MS; *n*-hexadecanoic acid

柴胡为我国传统中药,药用历史悠久。具有解表退热,舒肝解郁,升举阳气等功效。北柴胡 *Bupleurum chinese* DC. 为传统的柴胡品种,也是收载于《中国药典》2010年版的法定品种。竹叶柴胡 *B. marginatum* Wall. exDC. 为西南地区分布最为广泛的品种,且具有悠久的人工种植历史,生长旺盛,产

量高,为目前市场上柴胡药材的主要来源之一。目前收载于《四川省中药材标准》、《云南省中药材标准》和《贵州省中药材标准》。研究表明,柴胡挥发油是其发汗作用的物质基础,具有良好的解表退热作用^[1]。本文将竹叶柴胡与北柴胡的根部挥发油的化学成分进行比较分析,阐明品种间的差异及共

[收稿日期] 201040301(013)

[基金项目] 国家星火计划项目(2010GA810056)

[第一作者] 王砚,在读博士,从事中药品种、质量与资源开发研究, Tel:18628164090, E-mail:wangyan_8080@sina.com

[通讯作者] *王书林,教授,从事中药品种、质量与资源开发研究, E-mail:wslgap@163.com

性,为柴胡临床使用提供科学依据及物质基础。

柴胡挥发油成分较为复杂,据报道^[2-5],对柴胡挥发油进行分析研究的提取方法均为水蒸气蒸馏法。近年来,在挥发性成分研究领域,固相微萃取技术(solid phase microextraction, SPME)日益得到广泛的应用^[6]。SPME为非溶剂型萃取法,是一种新型的样品预处理方法,具有无溶剂干扰、对样品的富集能力强、操作简便以及易于与其他分析仪器联用等优点,尤为适合柴胡这种挥发油总量较小,但数量繁多的药材的提取。为全面了解竹叶柴胡和北柴胡的挥发油成分,笔者采用SPME-GC-MS对其成分进行比较。

1 材料与方法

1.1 材料 竹叶柴胡采集自四川省荣县正紫镇,经四川省食品药品检验所黎跃成主任药师鉴定为竹叶柴胡 *B. marginatum* Wall. ex DC.;北柴胡购自河北邯郸市,产地涉县,为中药地理标识样品。

1.2 仪器 6890-5973N型气相色谱-质谱联用仪(美国Agilent公司),手动固相微萃取装置(美国Supelco公司),萃取纤维头(100 μm PDMS, 7 μm PDMS, 85 μm PA), 5 mL SPME-GC专用采样瓶(美国Supelco公司)。

1.3 SPME取样条件 柴胡风干、取根、粉碎、过60目筛,称取粉末0.1 g,置于5 mL样品瓶中,盖上瓶盖密闭,恒温220 ℃,平衡15 min。将纤维头插入样品瓶中,萃取15 min,然后将萃取头拔出并迅速置入进样口(温度为250 ℃)解吸1 min。萃取头首次使用时,按说明书要求在气相色谱进样口上老化。

1.4 色谱条件 HP-5MS毛细管色谱柱(0.25 μm × 0.32 mm × 30 m),采用程序升温:初温45 ℃,以5 ℃·min⁻¹升至150 ℃,保持1 min,再以2 ℃·min⁻¹升至250 ℃,保持5 min结束,进样口温度250 ℃,载气为氦气,流速为1.0 mL·min⁻¹,不分流进样。

1.5 质谱条件 离子源温度230 ℃,电离方式EI,电子能量70 eV,四级杆温度150 ℃,电子倍增器电压2.28 kV,扫描范围 *m/z* 35 ~ 500,采用全扫描(Scan)工作方式。

1.6 鉴定 通过质谱获得的谱图,经计算机质谱库(NIST 11)检索及人工解析,确定化合物的结构;根据质谱离子流图的峰面积,应用峰面积归一化法确定各化合物的相对含量。

2 结果与讨论

2.1 固相微萃取条件的选择

2.1.1 萃取头的选择 按1.3项所述实验方法,分别考察100 μm PDMS, 7 μm PDMS, 85 μm PA 3种纤维头的萃取能力。以竹叶柴胡为样品,检出峰个数和色谱峰总面积为指标,结果在相同积分条件下,100 μm PDMS共检出58个峰,峰面积和为1.084 5 × 10⁹; 7 μm PDMS共检出19个峰,峰面积和为1.488 8 × 10⁸; 85 μm PA共检出53个峰,峰面积和为1.829 4 × 10⁹。综合峰个数和总峰面积的检出量,选用85 μm PA萃取头。85 μm PA萃取头对半挥发性极性化合物的萃取能力较强,也说明竹叶柴胡挥发油主要由极性的中小分子化合物组成。

2.1.2 取样量 萃取头的吸附量决定了样品用量,并且影响分析结果的重现性。实验分别选用0.1, 0.2, 0.4, 0.8 g竹叶柴胡样品粉末测试,考察色谱峰总面积,结果0.4 g样品用量所得峰总面积已经达到最高,此时样品体积约占4 mL样品瓶的1/4。说明0.4 g样品量为85 μm PA纤维头的极限萃取量,因此,样品量应控制在0.4 g以下。笔者选择峰个数和峰形都相对较好的0.2 g。

2.1.3 吸附平衡温度 萃取头的吸附量决定吸附温度和时间等条件,实验选定30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270 ℃ 9个温度点进行检测分析,以色谱峰总面积作为考察指标。结果表明,当吸附温度为210 ℃时,吸附量达到最高,因此吸附温度选取210 ℃。

2.1.4 吸附时间 实验选定5, 10, 15, 20, 30 min吸附时间进行分析,以色谱峰总面积作为考察指标。结果表明,吸附时间越长,吸附量越大,吸附15 min达平衡。因此选择15 min作为萃取吸附时间。

2.1.5 解吸条件的选择 解吸过程受进样口温度、解吸时间、待测物性质等因素影响,较高的解吸温度可以缩短解吸时间,但也会使某些物质发生热分解。设定实验温度为230, 240, 250 ℃,解吸时间为1, 2, 3 min。结果表明,总峰面积随解吸温度和时间增加而增加,当进样口温度为250 ℃,解吸时间超过1 min时,峰面积基本不变。因此,选择进样口温度为250 ℃,解吸时间为1 min。

2.2 成分分析结果

2.2.1 竹叶柴胡 SPME 结果分析(表2) 通过上述SPME-GC-MS方法分析获得竹叶柴胡挥发性物质的总离子流图(见图1)。各色谱峰对应的质谱图经人工解析及NIST11谱库检索进行分析,结果其中48个成分得到鉴定,其相对质量分数和为89.07%,未鉴定成分中无含量较高成分,鉴定结果见表1。结果表明竹叶柴胡挥发性成分主要是烷烃类、醛

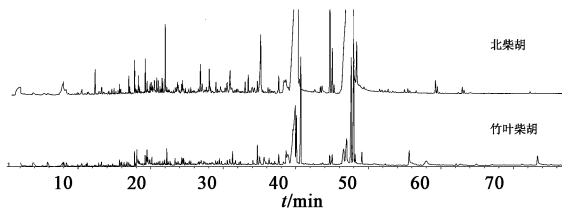


图 1 竹叶柴胡和北柴胡总离子流

类、酯类、酸类和苯环衍生物类,分别占挥发油总成分的 1.05%、3.00%、42.55%、32.30%、4.46%。挥发油中主要成分为 *n*-十六酸(19.13%)、十六酸乙酯(10.21%)、亚油酸甲酯(11.59%)和油酸乙酯(13.09%)等。

2.2.2 北柴胡 SPME 结果分析 通过上述 SPME-GC-MS 方法分析获得北柴胡挥发性物质的总离子

表 1 竹叶柴胡挥发油的 SPME-GC-MS 分析

No.	t_R /min	化合物名称	分子式	相对分子质量	相对质量分数/%
1	3.80	乙醛	$C_6H_{12}O$	100	0.95
2	5.79	庚醛	$C_7H_{14}O$	114	0.7
3	7.87	己酸	$C_6H_{12}O_2$	116	0.62
4	8.01	2-苯基-咪喃	$C_9H_{14}O$	138	0.47
5	8.39	辛醛	$C_8H_{16}O$	128	0.38
6	11.25	壬醛	$C_9H_{18}O$	142	0.18
7	12.84	2-丙烯醛	$C_9H_{16}O$	140	0.17
8	13.22	辛酸	$C_8H_{16}O_2$	144	0.29
9	16.01	肉桂醛	C_9H_8O	132	0.16
10	16.33	醋酸冰片酯	$C_{12}H_{20}O_2$	196	0.18
11	16.72	十三烷	$C_{13}H_{28}$	184	0.16
12	16.98	2-甲氧基-5-硝基苯酚	$C_9H_{10}O_2$	150	0.2
13	18.10	2,4-二异氰氧基-1-甲基苯	$C_9H_6N_2O_2$	174	1.15
14	18.46	2,4-二异氰氧基-1-甲基苯	$C_9H_6N_2O_2$	174	0.13
15	19.24	香草醛	$C_8H_8O_3$	152	0.46
16	19.62	5-羟基-4,7,7-三甲基二环庚烷	$C_{10}H_{16}O_2$	165	0.52
17	20.18	1a,2,3,5,6,7,7a,7b-八氢-1,1,7,7a-四甲基-1H-环丙烷[a]萘	$C_{15}H_{24}$	204	0.46
18	21.28	1,2,4a,5,6,8a-六氢-4,7-二甲基-1-(1-甲基乙基)-萘	$C_{15}H_{24}$	204	0.21
19	21.67	1,2,3,4,4a,5,6,8a-八氢-4a,8-二甲基-2-(1-甲基乙基)-, [2R-(2 α ,4 $\alpha\alpha$,8 $\alpha\beta$)]-萘	$C_{15}H_{24}$	204	0.24
20	21.92	十五烷	$C_{15}H_{32}$	212	0.37
21	22.23	1-甲基-4-(1,2,2-三甲基环戊基)-苯	$C_{15}H_{22}$	202	0.75
22	23.79	正十二烷酸	$C_{12}H_{24}O_2$	200	0.22
23	24.26	4,7,10,13,16,19-二十二碳六烯酸甲酯	$C_{23}H_{34}O_2$	342	0.43
24	24.44	石竹烯氧化物	$C_{15}H_{24}O$	220	0.6
25	28.96	川芎内酯	$C_{21}H_{32}O_2$	316	0.26
26	29.47	转移蒿本内酯	$C_{12}H_{14}O_2$	190	0.37
27	30.57	3,5,6,7,8,8a-六氢-4,8a-二甲基-6-(1-甲基乙烯基)-2(1H)萘酮	$C_{15}H_{22}O$	218	0.37
28	30.91	十四烷酸	$C_{14}H_{28}O_2$	228	0.66
29	31.29	菲	$C_{14}H_{10}$	178	0.95
30	32.38	2-乙基己基-水杨酸盐	$C_{15}H_{22}O_3$	250	0.25
31	34.09	6,10,14-三甲基-2-十五烷酮	$C_{18}H_{36}O$	268	0.29
32	34.72	邻苯甲二酸二丁酯	$C_{16}H_{22}O_4$	278	1.42

续表 1

No.	t_R /min	化合物名称	分子式	相对分子质量	相对质量分数/%
33	35.04	十五烷酸	$C_{15}H_{30}O_2$	242	1.09
34	36.33	十五酸乙酯	$C_{17}H_{34}O_2$	270	0.47
35	37.10	棕榈油酸	$C_{16}H_{30}O_2$	254	0.19
36	37.66	十六酸甲酯	$C_{17}H_{34}O_2$	270	0.83
37	38.67	十二烷酸邻苯二甲酸丁基酯	$C_{24}H_{38}O_4$	390	1.14
38	38.94	顺式-9-十六烯酸	$C_{16}H_{30}O_2$	254	2.41
39	39.62	<i>n</i> -十六烷酸	$C_{16}H_{32}O_2$	256	19.13
40	40.10	乙基-9-十六酸盐	$C_{18}H_{34}O_2$	282	4.1
41	40.70	十六酸乙酯	$C_{18}H_{36}O_2$	284	10.21
42	44.68	9,12-十八酸碳二烯酸甲酯	$C_{19}H_{34}O_2$	294	0.75
43	45.02	9-十八碳烯算甲酯	$C_{19}H_{36}O_2$	296	0.85
44	46.62	9,12-十八碳二烯酸	$C_{18}H_{32}O_2$	280	3.18
45	47.02	油酸	$C_{18}H_{34}O_2$	282	4.51
46	47.65	亚油酸甲酯	$C_{19}H_{34}O_2$	294	11.59
47	47.99	油酸乙酯	$C_{20}H_{38}O_2$	310	13.09
48	49.11	十八烷酸甲酯	$C_{20}H_{40}O_2$	312	0.96

表 2 北柴胡挥发油的 SPME-GC-MS 分析

No.	t_R /min	化合物	分子式	相对分子质量	相对质量分数/%
1	12.383	2,3-双氢-3,5-二羟基-6-甲基-4H-4-吡喃	$C_6H_8O_4$	144	1.39
2	16.996	2-甲氧基-4-乙烯基苯酚	$C_9H_{10}O_2$	150	1.07
3	18.32	5-戊基-2(3H)-双氢咪喃酮	$C_9H_{16}O_2$	156	0.24
4	19.249	香草醛	$C_8H_8O_3$	152	0.53
5	19.616	月桂醛	$C_{12}H_{24}O$	184	0.12
6	21.037	5-己基-2(3H)二氢咪喃酮	$C_{10}H_{18}O_2$	170	0.28
7	21.248	十二醇	$C_{12}H_{26}O$	186	0.33
8	22.22	1-甲基-4-(1,2,2-三甲基环戊基)-苯	$C_{15}H_{22}$	202	0.21
9	23.862	正十二烷酸	$C_{12}H_{24}O_2$	200	0.37
10	25.321	柏木脑	$C_{15}H_{26}O$	222	0.52
11	30.566	3,5,6,7,8,8a-六氢-4,8a-二甲基-6-(1-甲基乙烯基)-2(1H)萘酮	$C_{15}H_{22}O$	218	0.35
12	30.966	十四烷酸	$C_{14}H_{28}O_2$	228	1.11
13	34.715	1,2-苯二羧酸-2-(2-甲基丙基)酯	$C_{16}H_{22}O_4$	278	0.94
14	35.152	十五烷酸	$C_{15}H_{30}O_2$	242	2.25
15	40.214	<i>n</i> -十六烷酸	$C_{16}H_{32}O_2$	256	42.13
16	43.612	十七酸	$C_{17}H_{34}O_2$	270	0.35
17	44.681	9,12-十八碳二烯酸甲酯	$C_{19}H_{34}O_2$	294	0.33
18	47.129	9,12-十八碳二烯酸	$C_{18}H_{32}O_2$	280	27.11
19	47.307	9-十八碳烯酸	$C_{18}H_{34}O_2$	282	3.9
20	47.377	顺式-13-十八碳烯酸	$C_{18}H_{34}O_2$	282	1.09
21	48.079	十八烷酸	$C_{18}H_{36}O_2$	284	1.19

流图(见图1)。各色谱峰对应的质谱图经人工解析及NIST11谱库检索进行分析,结果其中21个成分得到鉴定,其相对质量分数和为85.81%,未鉴定成分中无含量较高成分,鉴定结果见表2。结果表明北柴胡挥发性成分主要是苯环衍生物类、醛类、酯类、酸类、醇类、杂环衍生物类,分别占挥发油总成分的1.63%,0.65%,1.27%,79.5%,0.33%,2.43%。挥发油中主要成分为*n*-十六酸(42.13%)、9,12-十八碳二烯酸(27.11%)、9-十八碳烯酸(3.90%)和十五烷酸(2.25%)等。

2.2.3 竹叶柴胡、北柴胡 SPME 结果比较 竹叶柴胡和北柴胡挥发油中均含有醛类、酯类、酸类以及苯环衍生物类成分。其中竹叶柴胡中酯类成分(42.55%)和酸类成分(32.30%)比例较大,而北柴胡酸类成分(79.5%)比例最高。另外竹叶柴胡含有的烷烃类成分(1.05%)为其独有,而北柴胡则含有的醇类成分(0.33%)及杂环衍生物类成分(2.43%)为其独有。以上说明竹叶柴胡和北柴胡挥发油存在成分组成上的区别,可供品种鉴定时参考。

同时,该2个品种的柴胡挥发油中含量最高的主要成分均为*n*-十六烷酸,并具有其余9种共有成分,见表3。

2.3 结论 SPME技术能全面快速地获得以上2种药材的挥发性成分信息,操作时间短,样品量小,无需萃取溶剂,避免溶剂对待测成分的干扰,更能全面了解柴胡药材中挥发油的化合物组成。为柴胡药材基源鉴定提供了科学的分析手段。

比较2种柴胡挥发油的总离子流图,发现2种柴胡挥发油的组成虽不尽一致,但挥发油主要组成类别一致,含量最高的主要成分一致,说明2种柴胡既存在同属植物的同性也存在不同种类的差异。表3中显示2种柴胡挥发油中含量最高的成分均为*n*-十六烷酸,结合其余9个共有峰,可进一步对竹叶柴胡和北柴胡的挥发油质量进行评估和稳定性考察。

表3 竹叶柴胡和北柴胡挥发油中共有成分

共有峰	化合物	相对质量分数/%	
		竹叶柴胡	北柴胡
1	2-甲氧基-4-乙基苯酚	0.2	1.07
2	香草醛	0.46	0.53
3	1-甲基-4-(1,2,2-三甲基环戊基)-苯	0.75	0.21
4	正十二烷酸	0.22	0.37
5	3,5,6,7,8,8a-六氢-4,8a-二甲基-6-(1-甲基乙基)-2(1H)萘酮	0.37	0.35
6	十四烷酸	0.66	1.11
7	十五烷酸	1.09	2.25
8	<i>n</i> -十六烷酸	19.13	42.13
9	9,12-十八碳二烯酸甲酯	0.75	0.33
10	9,12-十八碳二烯酸	3.18	27.11

此外,竹叶柴胡挥发油含有烷烃类成分,酯类成分所占比例最高,可由此与北柴胡区别,具有一定的鉴定意义。

[参考文献]

[1] 孙玲,杨倩,王金虎,等.柴胡挥发油毛细管GC指纹图谱研究[J].中国药物警戒,2011,8(8):5.
 [2] 郭济贤,潘胜利,李颖,等.中国柴胡属19种植物挥发油化学成分的研究[J].上海医科大学学报,1990,17(4):278.
 [3] 白宗利,王岩,贾天柱.柴胡醋制前后挥发油成分的GC-MS分析[J].中成药,2009,31(9):1397.
 [4] 刘群,葛发欢.柴胡挥发油化学成分分析[J].中药材,2003,26(9):15.
 [5] 李秀琴,孙秀燕,陈晓辉,等.柴胡挥发油质量的GC指纹图谱分析方法[J].中草药,2006,37(8):18.
 [6] 朱祥英,付宇飞,潘再法,等.金银花挥发性成分的HS-SPME-GC/MS研究[J].分析化学,2009,37(Z1):593.

[责任编辑 邹晓翠]