

· 化学与分析 ·

## 淫羊藿挥发油的指纹图谱

文治瑞<sup>1</sup>, 杨卫灵<sup>2</sup>, 田红红<sup>3</sup>, 谭高好<sup>2</sup>, 乙引<sup>3</sup>, 伍庆<sup>2\*</sup>

(1. 黔南民族师范学院 生命科学系, 贵州 黔南 558000;

2. 贵州师范大学 分析测试中心, 贵阳 550001; 3. 贵州师范大学 生命科学学院, 贵阳 550001)

**[摘要]** 目的:应用气相色谱-质谱(GC-MS)联用法对淫羊藿挥发油进行指纹图谱研究。方法:采用水蒸气蒸馏法提取巫山淫羊藿和粗毛淫羊藿中的挥发油,利用GC-MS对其化学成分进行分析,通过GC-FID建立了淫羊藿挥发油指纹图谱的分析方法。气相色谱条件为HP-INNOWAX色谱柱,进样口温度260℃,分流比5:1;程序升温(初始温度60℃,保持10min,以2℃·min<sup>-1</sup>升至250℃,保持13min)。GC-MS参数为柱流速1.0mL·min<sup>-1</sup>,MS电子能量70eV,离子源温度230℃,四级杆温度180℃,传输线温度280℃,全离子扫描,扫描质量范围m/z40~550,溶剂延迟3min。GC-FID参数:柱流速1.5mL·min<sup>-1</sup>,FID检测器温度260℃,氢气流量30mL·min<sup>-1</sup>,空气流量300mL·min<sup>-1</sup>,尾吹氮气30mL·min<sup>-1</sup>。结果:获得了20份不同产地淫羊藿的指纹图谱峰。结论:该方法的精密性、稳定性和重复性均良好。为淫羊藿药材的质量控制提供了有效手段。

**[关键词]** 淫羊藿; 挥发油; 气相色谱-质谱联用; 指纹图谱

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)07-0039-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2015070039

**Fingerprints of Volatile Oil from Epimedii Folium by GC-MS** WEN Zhi-rui<sup>1</sup>, YANG Wei-ling<sup>2</sup>, TIAN Hong-hong<sup>3</sup>, TAN Gao-hao<sup>2</sup>, YI Yin<sup>3</sup>, WU Qing<sup>2\*</sup> (1. Qiannan Normal College, Qiannan 558000, China; 2. Analysis and Testing Center of Guizhou Normal University, Guiyang 550001, China; 3. Life Sciences of Guizhou Normal University, Guiyang 550001, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the chromatographic fingerprints of volatile oil from Epimedii Folium by GC-MS. **Method:** The volatile oil was extracted from Epimedii Folium by steam distillation method, chromatographic fingerprints of which was detected and calculated by GC-FID, and the mutual fingerprints of ten kinds essential oil from Epimedii Folium was established. GC conditions: HP-INNOWAX column inlet temperature 260℃, the split ratio of 5:1; temperature program: initial temperature of 60℃, keep 10min, with 2℃·min<sup>-1</sup> rose to 250℃, 13min to maintain. GC-MS parameters: column flow rate 1.0mL·min<sup>-1</sup>, MS electron energy 70eV, ion source temperature of 230℃, the quadrupole temperature 180℃, the transmission line temperature 280℃, full-ion scan mass range m/z 40-550, solvent delay 3min. GC-FID parameters: column flow rate 1.5mL·min<sup>-1</sup>, FID detector temperature 260℃, the hydrogen flow rate 30mL·min<sup>-1</sup>, the air flow 300mL·min<sup>-1</sup>, tail blowing nitrogen 30mL·min<sup>-1</sup>. **Result:** The method was proved to be accuracy, reproducible and stability, by which the ideal fingerprints of volatile oil from Epimedii Folium were obtained. **Conclusion:** The methods set up are beneficial for the quality control of Epimedii Folium.

**[Key words]** Epimedii Folium; volatile oil; GC-MS; fingerprints

淫羊藿亦名仙灵脾,是我国传统补益类中药,具有补肾阳、强筋骨、祛风湿功能。用于治疗阳痿遗精、筋骨痿软、风湿痹痛、麻木拘挛等,淫羊藿全球有30个种,我国有19个种,5个变种。中国是淫羊藿

**[收稿日期]** 20140828(010)

**[基金项目]** 国家科技支撑计划项目(2011BAI13B04-01);2012年度教育部“创新团队发展计划”项目(IRT1227)

**[第一作者]** 文治瑞,在读硕士,从事植物学方面研究,Tel:13639018720,E-mail:wenzhi2003yy@163.com

**[通讯作者]** \*伍庆,教授,硕士生导师,从事分析化学方向研究,Tel:13984029735,E-mail:wq0851@126.com

属最主要分布区,约占世界总数的70%。本属植物均可药用,以箭叶淫羊藿、柔毛淫羊藿、巫山淫羊藿、朝鲜淫羊藿和粗毛淫羊藿使用最多。淫羊藿属植物的化学成分主要为黄酮、木脂素、生物碱和多糖,此外还有挥发油、棕榈酸、硬脂酸、油酸、亚麻酸等。其中挥发油具有发汗、理气、止痛、抑菌、矫味等作用<sup>[1-2]</sup>。目前已有多篇文献报道关于淫羊藿的质量控制及药材指纹图谱的研究<sup>[3-4]</sup>,但关于淫羊藿挥发油的指纹图谱研究还未见,考察了其他中药材挥发油指纹图谱研究的文献<sup>[5-12]</sup>之后,本实验采用了水蒸气蒸馏法提取巫山淫羊藿和粗毛淫羊藿的挥发油,运用GC-MS对其化学成分进行分析,并采用GC-FID建立了淫羊藿挥发油指纹图谱的分析方法。

## 1 材料

**1.1 仪器** HP-6890系列气相色谱仪(FID检测器),5890-5975系列气相色谱-质谱联用仪,NIST08质谱检索谱库(美国Agilent),AL-204型1/1万电子天平(Mettler,瑞士)。

**1.2 试药** 正己烷(分析纯),蒸馏水,无水硫酸钠。本实验收集了不同批次的淫羊藿药材共20份,按种类将其分为粗毛淫羊藿(采自修文基地S1~S10)和巫山淫羊藿(采自雷山基地S11~S20)两类。经贵阳中医学院魏升华教授鉴定为粗毛淫羊藿 *Epimedium acuminatum* 和巫山淫羊藿 *E. wushanense* 的干燥叶。

## 2 方法与结果

**2.1 色谱条件** 采用HP-INNOWAX色谱柱,气相色谱仪进样口温度260℃,分流进样,分流比5:1,程序升温(初始温度60℃,保持10 min,以2℃·min<sup>-1</sup>升至250℃,保持13 min)。GC-MS参数:柱流速1.0 mL·min<sup>-1</sup>,MS电子能量70 eV,离子源温度230℃,四级杆温度180℃,传输线温度280℃;全离子扫描,扫描质量范围 *m/z* 40~550;溶剂延迟3 min。GC-FID参数:柱流速1.5 mL·min<sup>-1</sup>,FID检测器温度260℃,氢气流量30 mL·min<sup>-1</sup>,空气流量300 mL·min<sup>-1</sup>,尾吹氮气30 mL·min<sup>-1</sup>。

**2.2 供试品溶液的制备** 参照2010年版《中国药典》一部附录XD挥发油测定甲法<sup>[13]</sup>,采用水蒸气蒸馏法。取各批次淫羊藿,阴干,粉碎,过40目筛。取药材粉末45 g于1 000 mL烧瓶中,加入蒸馏水500 mL,浸泡过夜后,在水蒸气蒸馏装置中加入2 mL正己烷,加热煮沸,至正己烷层颜色不变深,停止加热,取正己烷层,用无水硫酸钠干燥后,取1 μL

注入气相色谱仪。

### 2.3 淫羊藿挥发油指纹图谱的方法学考察

**2.3.1 淫羊藿挥发油成分及相对含量测定** 采用NIST08谱库检索结合质谱图解析,共鉴定出化学成分62种。其中棕榈酸相对百分含量最高,第58个峰为肉豆蔻酸,将其作为参照峰。

**2.3.2 精密度试验** 精密吸取同一供试品溶液,按2.1项下色谱条件进样测定,连续进样6次,记录色谱图。以肉豆蔻酸为参照峰,分别计算各共有峰的相对保留时间的RSD≤0.2%,相对峰面积的RSD≤3.4%。运用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”2004A版,采用中位数法计算相似度,精密度试验相关系数均>0.9,相似度结果在0.9~1.0,上述试验结果表明仪器精密度良好,符合指纹图谱要求。

**2.3.3 稳定性试验** 取同一供试品溶液,按照2.1项下色谱条件分别在0,2,4,8,12,24 h进样测定。以肉豆蔻酸为参照峰,分别计算各共有峰相对保留时间的RSD≤0.4%,相对峰面积的RSD≤3.3%。运用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”2004A版,采用中位数法计算相似度,稳定性试验相关系数均>0.9,相似度结果为1.0,上述试验结果表明供试品溶液在24 h内稳定性良好,符合指纹图谱要求。

**2.3.4 重复性试验** 按照2.2项下方法制备6份供试品溶液,照2.1项下色谱条件进样测定。以肉豆蔻酸为参照峰,分别计算各共有峰相对保留时间的RSD≤0.1%,相对峰面积的RSD≤3.3%。运用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”2004A版,采用中位数法计算相似度,重复性试验相关系数均>0.9,相似度结果为1.0,上述结果表明试验的重复性良好,符合指纹图谱要求。

### 2.4 淫羊藿挥发油指纹图谱的建立

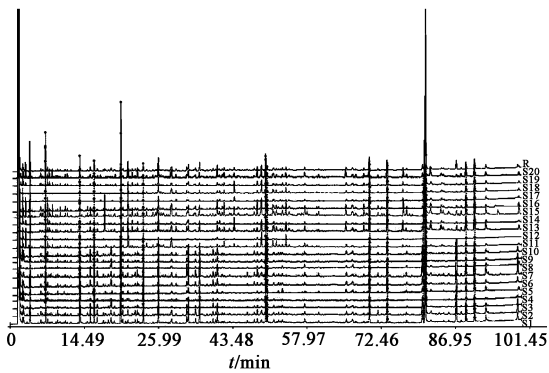
**2.4.1 指纹图谱的测定** 取20批样品,按2.2项下方法制备供试品溶液,按2.1项下色谱条件对样品进行测定。以肉豆蔻酸为参照峰,分别计算各特征峰的相对峰面积,相对峰面积的RSD偏差较大。运用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”2004A版,采用中位数法计算相似度,见表1。20批样品匹配图见图1。

**2.4.2 主成分分析与聚类分析** 研究中以化合物的峰面积为变量,探讨淫羊藿挥发油的聚类情况,主成分分析结果见图2,分析结果显示,1~10号样品距离较近,其中,2号样品有些偏离其他样品;11~20号样品距离较近。

表 1 20 批淫羊藿药材相似度

Table 1 20 batches Epimedii Folium similarity

	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S15	S16	S17	S18	S19	S20	R
S1	1.000	0.980	0.979	0.993	0.938	0.991	0.963	0.974	0.981	0.991	0.790	0.827	0.850	0.850	0.841	0.854	0.838	0.829	0.860	0.852	0.897
S2	0.980	1.000	0.942	0.975	0.877	0.951	0.994	0.925	0.960	0.951	0.714	0.747	0.771	0.767	0.756	0.773	0.751	0.742	0.780	0.770	0.826
S3	0.979	0.942	1.000	0.965	0.972	0.983	0.933	0.984	0.936	0.983	0.844	0.871	0.915	0.912	0.904	0.912	0.905	0.902	0.923	0.915	0.949
S4	0.993	0.975	0.965	1.000	0.915	0.988	0.954	0.955	0.991	0.988	0.773	0.817	0.822	0.825	0.817	0.834	0.806	0.800	0.836	0.828	0.875
S5	0.938	0.877	0.972	0.915	1.000	0.958	0.861	0.981	0.886	0.958	0.893	0.924	0.966	0.966	0.963	0.963	0.964	0.956	0.972	0.970	0.984
S6	0.991	0.951	0.983	0.988	0.958	1.000	0.928	0.983	0.977	0.966	0.833	0.880	0.886	0.893	0.886	0.899	0.875	0.867	0.899	0.893	0.931
S7	0.963	0.994	0.933	0.954	0.861	0.928	1.000	0.908	0.935	0.928	0.696	0.722	0.760	0.752	0.740	0.754	0.739	0.731	0.765	0.754	0.811
S8	0.974	0.925	0.984	0.955	0.981	0.983	0.908	1.000	0.940	0.983	0.855	0.885	0.924	0.922	0.918	0.924	0.919	0.913	0.932	0.928	0.952
S9	0.981	0.960	0.936	0.991	0.886	0.977	0.935	0.940	1.000	0.977	0.747	0.800	0.786	0.795	0.787	0.805	0.773	0.765	0.803	0.796	0.844
S10	0.991	0.951	0.983	0.988	0.958	0.965	0.928	0.983	0.977	1.000	0.833	0.880	0.886	0.893	0.886	0.899	0.875	0.867	0.899	0.893	0.931
S11	0.790	0.714	0.844	0.773	0.893	0.833	0.696	0.855	0.747	0.833	1.000	0.960	0.924	0.939	0.948	0.951	0.916	0.942	0.944	0.947	0.920
S12	0.827	0.747	0.871	0.817	0.924	0.880	0.722	0.885	0.800	0.880	0.960	1.000	0.939	0.969	0.970	0.978	0.934	0.938	0.965	0.961	0.957
S13	0.850	0.771	0.915	0.822	0.966	0.886	0.760	0.924	0.786	0.886	0.924	0.939	1.000	0.988	0.988	0.982	0.991	0.988	0.990	0.989	0.983
S14	0.850	0.767	0.912	0.825	0.966	0.893	0.752	0.922	0.795	0.893	0.939	0.969	0.988	1.000	0.998	0.994	0.990	0.986	0.996	0.994	0.991
S15	0.841	0.756	0.904	0.817	0.963	0.886	0.740	0.918	0.787	0.886	0.948	0.970	0.988	0.998	1.000	0.996	0.990	0.989	0.995	0.997	0.987
S16	0.854	0.773	0.912	0.834	0.963	0.899	0.754	0.924	0.805	0.899	0.951	0.978	0.982	0.994	0.996	1.000	0.980	0.983	0.994	0.995	0.988
S17	0.838	0.751	0.905	0.806	0.964	0.875	0.739	0.919	0.773	0.875	0.916	0.934	0.991	0.990	0.990	0.980	1.000	0.992	0.991	0.990	0.981
S18	0.829	0.742	0.902	0.800	0.956	0.867	0.731	0.913	0.765	0.867	0.942	0.938	0.988	0.986	0.989	0.983	0.992	1.000	0.989	0.992	0.975
S19	0.860	0.780	0.923	0.836	0.972	0.899	0.765	0.932	0.803	0.899	0.944	0.965	0.990	0.996	0.995	0.994	0.991	0.989	1.000	0.996	0.992
S20	0.852	0.770	0.915	0.828	0.970	0.893	0.754	0.928	0.796	0.893	0.947	0.961	0.989	0.994	0.997	0.995	0.990	0.992	0.996	1.000	0.987
R	0.897	0.826	0.949	0.875	0.984	0.931	0.811	0.952	0.844	0.931	0.920	0.957	0.983	0.991	0.987	0.988	0.981	0.975	0.992	0.987	1.000



S1 ~ S20. 20 批样品; R. 共有模式

图 1 20 批淫羊藿药材指纹谱叠加

Fig. 1 20 batches Epimedii Folium fingerprint overlay

采用 SPSS 统计软件对 20 批淫羊藿样品进行聚类分析, 采用组间连接法, 利用 Euclidean 距离测量技术, 聚类分析结果见图 3。结果显示, 20 批淫羊藿药材可分为三大类: 3, 4, 5, 6, 8, 10 号为第一类; 11 ~ 20 号为第二类; 1, 2, 7, 9 为第三类。

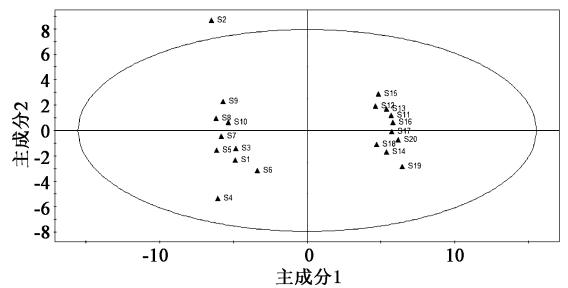


图 2 淫羊藿挥发油主成分分析

Fig. 2 Epimedii Folium volatile oil principal component analysis

### 3 结论与讨论

**3.1 挥发油提取方法的选择** 挥发油的提取方法有水蒸气蒸馏提取法, 溶剂提取法, 超临界萃取法等, 每种提取方法各有优劣, 本实验采用 2010 年版《中国药典》一部中挥发油项的实验方法, 即水蒸气蒸馏提取方法<sup>[13]</sup>, 并结合溶剂萃取, 减少了药材用量, 节约了成本。

**3.2 检测器的选择** 淫羊藿中挥发油成分复杂, 大多数为未知化合物, 故本实验先采用质谱检测器对

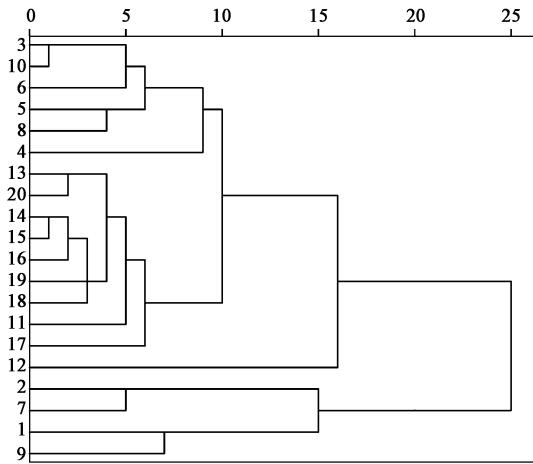


图 3 20 批淫羊藿挥发油聚类分析

Fig. 3 20 batches Epimedii Folium cluster analysis of volatile oil

其定性,确定样品中化合物的化学式,及其相对百分含量。对于挥发油指纹图谱部分,选择 FID 检测器,与 MS 相比虽然灵敏度较低,但其使用的载气为氮气可以大大节约成本,且可达到相同效果。

**3.3 程序升温的考察** 程序升温是气相色谱分析方法的核心环节<sup>[14]</sup>,科学的程序升温有助于提高分离效果,缩短分析时间,提高分析效率。由于挥发油的成分复杂,且指纹图谱要求尽可能将各个化合物峰分开,因此程序升温成为方法开发的重中之重。本实验经过多次调试最终确定了一阶程序升温。在此条件下各个峰都能较好的分离,且峰型良好,出峰时间适中。

**3.4 指纹图谱研究意义** 对于大多数中药材而言,其药效来自于多种活性成分,传统的中药质量评价方法仅对其中单一活性成分进行定性定量分析,这使中药材的品质评价存在弊端。GC-MS 具有定性的优点,利用 GC-MS 对淫羊藿挥发油指纹图谱方法的建立能够有效控制淫羊藿药材的质量。

[参考文献]

[1] 樊家乙. 简述淫羊藿的研究进展[J]. 求医问药, 2013, 11(1): 484-485.

[2] 郭丽娜, 马莹慧, 赵伟, 等. 淫羊藿属植物中化学成分分析研究进展[J]. 中国新药杂志, 2013, 22(8): 919-922 + 936.

[3] 朱粉霞, 赵永刚, 贾晓斌, 等. 淫羊藿炮制前后 UPLC-PDA-MS 的指纹图谱研究[J]. 化学学报, 2012, 70(5): 635-642.

[4] 王丽霞, 王超展, 耿信笃. 淫羊藿属药材反相高效液相色谱指纹图谱及质量评估研究[J]. 化学学报, 2006, 64(6): 551-555.

[5] 刘玉红, 刘倩伶, 黄志芳, 等. 不同基源郁金挥发油 GC 指纹图谱的比较[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(24): 166-170.

[6] 赵喜兰, 常陆林, 任丽平. 栀子花挥发油油的 GC-MS 指纹图谱[J]. 安徽农业科学, 2009(8): 3355-3356.

[7] 张艳, 胡金波, 李金凤, 等. 山苍子油 GC-MS 指纹图谱研究[J]. 中成药, 2013, 35(11): 2452-2456.

[8] 赵祥升, 魏建和, 甘炳春, 等. 降香挥发油 GC 指纹图谱的研究[J]. 中国现代应用药学, 2011, 28(11): 995-999.

[9] 周颖, 庞兴寿. 姜三七挥发油指纹图谱研究[J]. 中南药学, 2013, 11(11): 837-839.

[10] 唐英, 陈欣, 沈平嬢. 紫苏叶中挥发油类成分的指纹图谱研究[J]. 上海中医药杂志, 2013, 47(524): 82-86.

[11] 赵喜兰, 常陆林, 任丽平. 栀子花挥发油的 GC-MS 的指纹图谱[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(8): 3355-3356.

[12] 陆继伟, 苗水, 杨新华, 等. 薄荷素油的气相色谱法指纹图谱研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2013, 23(8): 1885-1887.

[13] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 156.

[14] 吴素香, 孙静芸, 盛春. GC 法建立蓝桉挥发油指纹图谱研究[J]. 中成药, 2008, 30(3): 318-320.

[责任编辑 顾雪竹]