

肾茶 GC-MS 指纹图谱

刘斌¹, 刘国良¹, 李艳薇¹, 牟璐璐², 方衡², 张宁¹, 刘海洋^{1*}

(1. 黑龙江中医药大学佳木斯学院, 黑龙江佳木斯 154007; 2. 佳木斯大学, 黑龙江佳木斯 154007)

[摘要] 目的:建立肾茶挥发性成分的 GC-MS 指纹图谱。方法:采用 GC-MS 结合程序升温保留指数技术对 12 批肾茶样品进行分析, DB-5MS 色谱柱, 载气氦气(He), 流速 1 mL·min⁻¹, 进样量 1 μL, 分流比 100:1。质谱条件为电子轰击(EI)离子源, 辅助线温度 280 ℃, 离子源 230 ℃, 四极杆 150 ℃; 质量扫描范围 *m/z* 30~600。结果:分析了 12 个批次的肾茶样品, 建立了肾茶挥发性成分 GC-MS 的指纹图谱, 鉴定了 13 个共有色谱峰成分。采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件”(2004 A 版)进行指纹图谱分析, 12 批肾茶样品相似度均 >0.999。结论:GC-MS 结合程序升温保留指数技术能较为全面地反映肾茶挥发性成分, 所建立的肾茶 GC-MS 指纹图谱特征性及专属性强, 可作为肾茶挥发性成分质量控制的有效方法。

[关键词] 肾茶; 气相色谱-质谱联用; 挥发性成分; 保留指数; 指纹图谱

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)13-0059-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016130059

GC-MS Fingerprint of *Clerodendranthus spicatus*

LIU Bin¹, LIU Guo-liang¹, LI Yan-wei¹, MU Lu-lu², FANG Heng², ZHANG Ning¹, LIU Hai-yang^{1*}

(1. Jiamusi College, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Jiamusi 154007, China;

2. Jiamusi University, Jiamusi 154007, China)

[Abstract] **Objective:** To establish GC-MS fingerprint of *Clerodendranthus spicatus* volatile components.

Method: Volatile components in twelve batches of *C. spicatus* samples were analyzed by GC-MS method combined with temperature-programmed retention index technique. Research was performed on DB-5MS chromatographic column; carrier gas was helium (He), its flow rate was 1.0 mL·min⁻¹, and the injection volume was 1 μL, the refractive ratio of distillation was 100:1. MS conditions were as follows: electron impact (EI) ion source, transmission line temperature of 280 ℃, ion source temperature of 230 ℃, quadrupole temperature of 150 ℃, and mass scan range of *m/z* 30-600. **Result:** Thirteen common peaks were identified in the GC-MS fingerprint of volatile components from 12 batches of *C. spicatus* samples. *Similarity Evaluation System for Chromatographic Fingerprint of Chinese Materia Medica* (Version 2004 A) was used for fingerprint analysis. Similarity of 12 batches of *C. spicatus* samples was higher than 0.999. **Conclusion:** GC-MS combined with temperature-programmed retention index can more comprehensively reflect the volatile components of *C. spicatus*. The established GC-MS fingerprint is highly characteristic and specific, which can be used as an effective method for quality control of volatile components of *C. spicatus*.

[Key words] *Clerodendranthus spicatus*; GC-MS; volatile components; retention index; fingerprint

肾茶又名猫须草、猫须公、“牙努秒”,唇形科肾茶属多年生草本植物^[1]。肾茶主要含有黄酮类化

合物、酚酸、甾体、氨基酸、多酚、多糖、精油等成分。其中多酚是肾茶叶子中最主要成分,其主要活性成

[收稿日期] 20150507(004)

[基金项目] 黑龙江省教育厅科学技术研究项目(12541758)

[第一作者] 刘斌,副教授,从事中药药效物质基础研究, Tel:0454-6050350, E-mail:2214540333@qq.com

[通讯作者] *刘海洋,讲师,从事方剂药效物质基础及配伍规律研究, Tel:0454-6050350, E-mail:2577376527@qq.com

分有迷迭香酸、熊果酸、黄酮和肌醇等^[2-4]。肾茶的药理作用主要为抗炎、抗氧化、抗凝、抗感染、免疫调节、利尿等^[5],近年来有应用单味肾茶及其复方制剂治疗尿路感染^[6],尿路结石^[7],肾衰竭^[8]和肾病综合征^[9]的报道。在气相和液相色谱分析中,色谱保留指数是色谱定性的一种较为可靠的分析参数,因此,本研究通过 GC-MS 结合程序升温保留指数技术对肾茶中的挥发性成分进行详细的表征,为肾茶的质量控制及临床应用提供依据。

Van Den Dool 和 Kratz^[10]在 1963 年对程序升温保留指数进行了定义为 $I_X^T = 100n + 100[(T_{R_x} - T_{R_n}) / (T_{R_{(n+1)}} - T_{R_n})]$,式中 T_R 为保留温度, x 代表待测的化合物, n 和 $n + 1$ 分别表示正构烷烃的碳原子数。对于单一的线性升温程序,可用相对应的保留时间 t_R 代替 T_R 。自动质谱去卷积鉴定系统 (AMDIS) 是具有对正构烷烃系列 (连续与不连续的) 进行保留指数的自动计算功能软件,可提高对重叠峰的分辨解析能力,为气相色谱的定性分析提供了有效的工具^[11]。

1 材料

6890N-5975B 型气相色谱-质谱联用仪 (美国安捷伦公司), BT224S 型 1/10 万电子天平 (德国赛多利斯公司), FW135 型中草药粉碎机 (天津泰斯特仪器有限公司), BC-W205 型恒温水浴锅 (上海贝凯生物化工设备有限公司), R-201 型旋转蒸发器 (上海中胜生物技术有限公司), SHZ-III D 型循环水真空泵 (上海亚荣生化仪器厂)。二氯甲烷, 乙酸乙酯, 丙酮分析纯。

正构烷烃对照品 ($C_8 \sim C_{40}$, 上海西域机电股份有限公司); 12 批肾茶药材于 2012 年 1 月—12 月采集, 取样于西双版纳傣族自治州南药园, 经李学兰研究员鉴定为唇形科多年生草本植物肾茶 *Clerodendranthus spicatus*。集齐 12 个月份的药材进行统一试验, 在收集每月份的药材后进行粉碎、烘干等操作后保存。

2 方法与结果

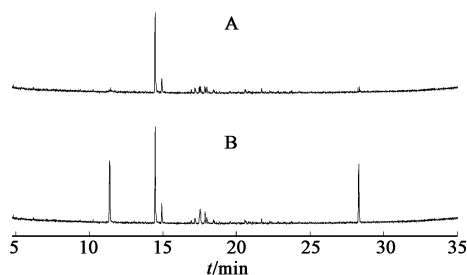
2.1 供试品溶液的制备 称取肾茶 (粉碎过 50 目筛) 粉末约 4.0 g, 置于 50 mL 圆底烧瓶中, 加入丙酮-乙酸乙酯-二氯甲烷 (2:1:1) 混合溶剂 40 mL, 称定质量, 在 77~80 °C 水浴中加热回流 1 h, 循环水冷却, 放冷后以混合溶剂补足失重, 过滤, 减压浓缩定容至 5 mL, 过 0.45 μm 微孔滤膜, 取续滤液作为供试品溶液。

2.2 色谱条件 DB-5MS 弹性石英毛细管柱 (0.25

mm × 30 m, 0.25 μm), 载气 He, 流速 1 mL·min⁻¹, 前进样口温度 240 °C, 分流进样, 分流比 100:1, 辅助线温度 280 °C, 初始温度 70 °C, 进样量 1 μL; 梯度升温 (0~6 min, 70~100 °C; 6~8 min, 100~140 °C; 8~13.33 min, 140~220 °C; 13.33~19.33 min, 220~250 °C), 后运行温度 280 °C, 后运行时间 10 min, 电子轰击离子源 (EI), 离子源温度 230 °C, 四极杆温度 150 °C, 采集模式为全扫描, 质量扫描范围为 m/z 30~600, 溶剂延迟时间 4 min。

2.3 供试品溶液制备方法的选择

2.3.1 提取方法的选择 称取 2 份肾茶药材 (过 50 目筛) 粉末, 每份约 4.0 g, 分别以乙酸乙酯 40 mL 超声和加热回流法提取制备供试品溶液进行分析, 记录相应色谱图进行比较, 见图 1, 结果表明加热回流提取比有机溶剂超声获得的色谱信息多, 并且色谱峰峰型较好, 故本试验采用加热回流方法进行提取。



A. 超声提取样品; B. 加热回流提取样品

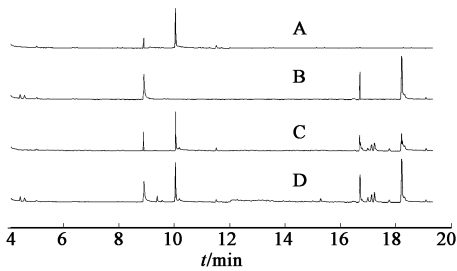
图 1 不同方法提取肾茶样品 GC-MS 总离子流

Fig. 1 Different methods of *Clerodendranthus spicatus* sample GC-MS total ion chromatogram

2.3.2 提取溶剂的选择 称取 4 份肾茶药材粉末 (过 50 目筛), 每份 4.0 g, 置于圆底烧瓶中, 分别加入丙酮、乙酸乙酯、二氯甲烷、丙酮-乙酸乙酯-二氯甲烷 (2:1:1) 的混合溶剂各 40 mL, 在 77~80 °C 水浴中加热回流提取 1 h 后处理分析, 见图 2。结果表明混合溶剂提取得到的色谱峰最多, 有效综合了各溶剂的提取信息, 且峰形较好、效果最佳, 故本试验采用混合溶剂作为提取溶媒。

2.4 精密度试验 取同一供试品溶液, 在 2.2 项下色谱条件连续进样 6 次, 各色谱峰相对保留时间稳定, RSD 在 0.3%~2.4%, 各色谱峰相对峰面积基本一致, RSD 在 1.1%~2.8%。表明仪器精密度良好。

2.5 重复性试验 平行制备 6 份供试品溶液在上述分析条件下分别测定, 各色谱峰相对保留时间稳定, RSD 在 0.1%~2.6%, 各色谱峰相对峰面积基本一



A. 丙酮提取样品; B. 二氯甲烷提取样品; C. 乙酸乙酯提取样品; D. 混合溶剂提取样品

图 2 不同溶剂提取肾茶样品 GC-MS 总离子流

Fig. 2 Different solvent extraction of *Clerodendranthus spicatus* sample GC-MS total ion chromatogram

致, RSD 在 1.4% ~ 3.0%。表明该方法重复性良好。

2.6 稳定性试验 取同一供试品溶液在上述分析条件下, 分别在 0, 2, 4, 8, 16, 24 h 测定, 各色谱峰相对保留时间稳定, RSD 在 0.4% ~ 3.0%, 各色谱峰相对峰面积基本一致, RSD 在 1.0% ~ 3.0%。表明样品在 24 h 内稳定性良好。

2.7 肾茶指纹图谱的测定

2.7.1 参照峰的选择 在 GC-MS 指纹图谱中选择出峰时间适中且稳定的色谱峰作为参照峰, 结果 10.047 min 色谱峰符合此条件, 经正构烷烃定性分析认定为二甲基异丁基甲醇的色谱峰, 因此选择此峰作为参照峰(S 峰)。

2.7.2 指纹图谱的测定 按照 2.1 项下供试品溶液制备 12 批肾茶样品, 按 2.2 项下色谱条件进行测定, 得到 12 批肾茶的指纹图谱, 见图 3。使用“中药色谱指纹图谱相似度评价软件系统”(2004A) 进行数据分析, 建立肾茶挥发性成分 GC-MS 指纹图谱的共有模式(均值法), 见图 4。以共有模式为模板, “相关系数”法计算指纹图谱的相似度, 不同批次样品的相关系数在 0.999 1 ~ 0.999 9, 说明各批次肾茶具有良好的一致性。

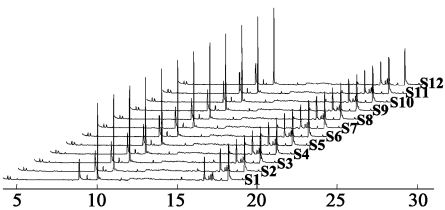


图 3 12 个批次肾茶 GC-MS 指纹谱

Fig. 3 Twelve batches *Clerodendranthus spicatus* GC-MS fingerprints

取 12 批肾茶样品各 1 μ L, 正构烷烃参照系样品 1 μ L, 分别进样, 通过自动质谱去卷积鉴定系统 AMDIS 计算各组分保留指数, 辨认总离子流图中重

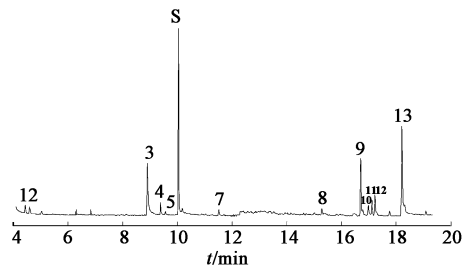


图 4 肾茶 GC-MS 指纹谱 13 个共有峰

Fig. 4 13 common peaks of *Clerodendranthus spicatus* GC-MS fingerprint

叠峰和同分异构现象, 有效确定挥发性成分的化学组成, 结果见表 1。

3 讨论

本试验从样品的采集、样品制备和色谱条件 3 方面进行了大量探索。通过对总离子流图全貌的考察最终确定以丙酮-乙酸乙酯-二氯甲烷(2:1:1)的混合溶剂在加热回流条件下提取获得色谱信息最丰富, 效果最佳。重复性及相似度考察均说明本试验建立的指纹图谱准确可靠。指纹图谱对比得到不同月份采集的肾茶主成分基本相同, 提示固定产地的肾茶稳定性较好, 拟进一步针对不同产地进行深入分析, 最终确定肾茶挥发油指纹图谱的主要特征成分群及其相对含量, 客观评价肾茶的内在质量, 为肾茶挥发性成分的研究提供依据。

中药成分复杂, 同分异构现象十分普遍。由于质谱数据不能分辨构象异构等异构体, 而有时在不同保留时间出的色谱峰通过质谱库的单独检索是同一物质, 这为样品的定性带来了很大的困扰^[12]。通过对总离子流图分辨得到各组分纯色谱和光谱后, 再用质谱库对分辨出的组分进行定性检索, 得到初步定性结果, 再根据正构烷烃计算各物质的保留指数, 经质谱和保留指数联合对肾茶进行定性, 为更加科学、准确地反映肾茶的内在品质奠定实践基础, 同时为完善肾茶药材的质量标准及进一步开发利用肾茶资源提供参考。

试验结果表明, 肾茶指纹图谱共有峰中主要含有醇、酮、萜、烷烃、酸、醛、酯等物质。有关文献报道肾茶通过尿碱化作用, 增加尿酸排泄量来促进尿石的排出, 还可以通过增加电解质和水分的排泄以及减少钠离子、氯离子的重吸收起到健肾的作用^[13]。迷迭香酸和熊果酸与肾茶的抗炎作用相关, 迷迭香酸通过抑制花生四烯酸代谢中的 5-脂氧酶(5-OL)来达到抗炎的效果, 而熊果酸则是抑制花生四烯酸代谢中的环氧化酶及过氧化物酶^[14]。本文通过建立

表 1 肾茶 GC-MS 指纹图谱共有峰归属认定

Table 1 *Clerodendranthus spicatus* GC-MS fingerprint ascribed identified

No.	保留时间	化学成分	分子式	相对分子质量	相对峰面积/%
1	4.443	ethylbenzene	C ₈ H ₁₀	106	0.874
2	4.597	1,3-xylene	C ₈ H ₁₀	106	1.178
3	8.906	3-pyrroline	C ₄ H ₇ N	69	10.691
4	9.391	oxalic acid	H ₂ C ₂ O ₄	90	2.076
5	9.438	benzyl cyanide	C ₈ H ₇ N	117	0.765
6	10.047	2,4-dimethyl-2-pentanol	C ₇ H ₁₆ O	116	19.330
7	11.518	2-methylnaphthalene	C ₁₁ H ₁₀	142	0.774
8	15.284	myristyltrimethylammonium bromide	C ₁₇ H ₃₈ BrN	336	1.432
9	16.710	butanoic acid, 3,7-dimethyl-6-octenyl ester	C ₁₄ H ₂₆ O	210	7.975
10	17.125	diisobutyl phthalate	C ₁₆ H ₂₂ O ₄	278	1.364
11	17.232	butanoic acid, 3,7-dimethyl-6-octenyl ester	C ₁₄ H ₂₆ O	210	4.336
12	17.282	3,7-dimethyl-1-octanol	C ₁₂ H ₂₆ O	186	0.083
13	19.094	undecanal	C ₁₁ H ₂₂ O	170	1.228

肾茶指纹图谱,鉴定了同一地区不同月份的 12 批次肾茶的共有峰,对于肾茶的内在质量控制和新药开发具有现实的意义。

[参考文献]

[1] 肖伟,彭勇,刘勇,等. 肾茶的研究与开发新进展[J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2009, 11(3): 434-438.

[2] 陈伊蕾,谭俊杰,陆露璐,等. 肾茶水溶性成分的研究[J]. 中药材, 2009, 40(5): 689-693.

[3] 斯建勇,李国清,郭剑,等. 肾茶水溶性成分的研究[J]. 中草药, 1996, 27(7): 393-394.

[4] 蔡华芳,寿燕,汪菁菁,等. 肾茶的药理作用初探[J]. 中药材, 1997, 20(1): 38-40.

[5] 刘光剑,黄荣桂,郑兴中,等. 肾茶对糖尿病大鼠肾脏的保护作用及其机制研究[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2007, 8(1): 32-34.

[6] 黄荣桂. 肾茶治疗血尿的临床研究[J]. 中国综合医学, 1994, 22(2): 288-289.

[7] 黄荣桂,沈文通,郑兴中,等. 肾茶对尿路结石的治疗

作用[J]. 福建医科大学学报, 1999, 33(4): 402-405.

[8] 黄昆明. 肾茶治疗多囊肾慢性肾功能不全的临床应用[J]. 疾病控制杂志, 2000, 4(1): 19.

[9] 黄彬. 肾茶合泼尼松治疗肾病综合征 33 例临床观察[J]. 中国中西医结合急救杂志, 1999, 6(12): 550-551.

[10] Dool H V D, Kratz P D. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography[J]. J Chromatogr, 1963, 11(C): 463-471.

[11] Daveist. The new automated mass spectrometry deconvolution and identification system (AMDIS) [J]. Spectroscopy Europe, 1998, 10(3): 24-27.

[12] 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, 1(1): 84-87.

[13] 张平. 肾茶的研究进展[J]. 中国野生植物资源, 2000, 19(5): 16-19.

[14] 李月婷,黄荣桂,郑兴中. 肾茶的研究进展[J]. 中国中西医结合杂志, 2002, 22(6): 470-472.

[责任编辑 顾雪竹]