

神农香菊挥发油 GC-MS 指纹图谱

林杰, 卢金清*, 江汉美*, 李肖爽, 屠寒, 周坤
(湖北中医药大学 湖北省药用植物研发中心, 武汉 430065)

[摘要] 目的:建立了神农香菊挥发油 GC-MS 指纹图谱分析测定方法,为神农香菊药材的质量控制提供参考。方法:采用水蒸气蒸馏法提取神农香菊挥发油,用 GC-MS 联用技术对神农香菊进行指纹图谱测定,并采用国家药品监督管理局推荐的中药指纹图谱计算软件进行计算,建立神农香菊挥发油的共有指纹图谱。结果:神农香菊挥发性成分中含有 23 个特征性指标成分,初步建立了以此 23 个共有峰为特征指纹信息的 GC-MS 指纹图谱。结论:该方法具有较好的重复性、精密度和稳定性(RSD 均 <5%),建立的神农香菊挥发油指纹图谱为其质量控制奠定了基础。

[关键词] 神农香菊;挥发油;气相色谱-质谱;指纹图谱

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2016)17-0059-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016170059

GC-MS Fingerprint of Volatile Oil from *Dendranthema indicum* var. *aromaticum*

LIN Jie, LU Jin-qing*, JIANG Han-mei*, LI Xiao-shuang, TU Han, ZHOU Kun
(Hubei University of Chinese Medicine, Research and Development Center of
Medicinal Plant in Hubei Province, Wuhan 430065, China)

[Abstract] **Objective:** To establish GC-MS fingerprint determination method of volatile oil from *Dendranthema indicum* var. *aromaticum*, and provide the reference for the quality control of *D. indicum* var. *aromaticum* medicinal materials. **Method:** The steam distillation method was used to extract the volatile oil from *D. indicum* var. *aromaticum*; the combined technology of GC-MS was used to determin its fingerprints, and Fingerprint Calculation Software of traditional Chinese medicine recommended by State Drug Administration was used for calculation, in order to establish the common fingerprints of volatile oil from *D. indicum* var. *aromaticum*. **Result:** There were 23 main characteristic components in the volatile oil from *D. indicum* var. *aromaticum*, and GC-MS fingerprint with these 23 common peaks was established preliminarily. **Conclusion:** The method is repeatable, accurate and stable, which can be used for quality control of the *D. indicum* var. *aromaticum*.

[Key words] *Dendranthema indicum* var. *aromaticum*; volatile oil; GC-MS; fingerprint

神农香菊为野菊花的一个变种。原植物产于湖北神农架地区,分布在海拔 2 000 m 以上的向阳开阔的山坡、路旁、岩石缝、灌木丛边的空旷地中,具有疏风清热、平肝明目、散风降压的功效。与原变种相比,神农香菊的主要特点在于花、叶均具有显著香气,其特别的浓郁香味是衡量其市场价格的重要指标之一。神农香菊精油中主要含有萜烯类、醇类、醛

酮类等挥发性成分^[1],有较强的的抑菌作用^[2];神农香菊精油对猪油的脂质过氧化有很好的保护效果,对铁离子有较强的还原能力,其抗氧化能力明显强于维生素 C^[3]。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,

[收稿日期] 20151124(020)

[第一作者] 林杰,硕士,从事中药及其天然药物活性成分的研究,Tel:18771102776,E-mail:linjiesl@163.com

[通讯作者] *卢金清,教授,从事中药及其天然药物活性成分的研究,Tel:027-68890101,E-mail:ljq59169@sohu.com;

*江汉美,教授,从事中药新制剂及其剂型的研究,Tel:027-68890101,E-mail:jianghm-666@163.com

建立中药材的指纹图谱已成为评价中药材品质的重要方法^[4-7]。将中药指纹图谱中化学成分的变化与中药药效结果联系起来,建立起有实际意义的中药“谱效”关系学,“谱效结合”现已成为解决中药质量控制基本问题的治本之策,并被广泛应用^[8-13]。虽然迄今为止有关神农香菊药材的挥发性成分分析文献较多,但对于神农香菊的 GC-MS 指纹图谱的建立,国内还未见有专题报道,本实验在用 GC-MS 法对不同批次神农香菊挥发性成分分析鉴定的基础上,建立了神农香菊挥发性成分 GC-MS 指纹图谱,为神农香菊药材的质量评价和 GAP 实施提供科学依据。

1 材料

1.1 仪器 挥发油提取器,电热套(天津泰斯特,1 000 mL,350 W,220 V),ALC-210.2 型电子天平(Sartorius),KQ-250E 型声波清洗器(昆山舒美),6890GC/5973MSD 型气质联用仪(美国安捷伦公司),NIST05 系列标准谱库,中药色谱指纹图谱相似度评价系统(A 版),自动质谱图解卷积和鉴定系统软件[MDIS,美国国家标准技术研究院(NIST)提供]。

1.2 药物 正构烷烃对照品 40 g·L⁻¹(C8 ~ C20, Sigma, Lot#BCBK5370V),所用试剂均为分析纯。15 批样品分别由武汉黄鹤楼香精香料有限公司采收于不同地区不同时间,经湖北中医药大学学生药教研室胡志刚副教授鉴定均为菊科菊属植物神农香菊 *Dendranthema indicum* var. *aromaticum* 的干燥头状花序。

2 方法与结果

2.1 供试品溶液制备 取 15 批次神农香菊药材各 50 g(剪碎),加 8 倍量(400 mL)水浸泡 3 h,然后按照 2010 年版《中国药典》挥发油测定法提取神农香菊挥发油,连续提取 5 h,得油状物,冷却放置后收集,密封,置于冰箱中冷藏,作为供试品溶液。

2.2 色谱条件 HP-5MS 毛细管柱(0.2 mm × 50 m,0.33 μm);程序升温,色谱柱初始温度为 50 ℃,以 5 ℃·min⁻¹ 的升温速率升至 145 ℃,然后再以 2 ℃·min⁻¹ 的升温速率升至 165 ℃,最终用 20 ℃·min⁻¹ 的升温速率升至 250 ℃,保持 5 min。进样口温度 200 ℃,载气 99.999% 氮气,载气流速 0.8 mL·min⁻¹,分流比 20:1,溶剂延迟 3 min。倍增管电压 1.2 kV,离子源温度 230 ℃,四级杆温度 150 ℃,电子能量 70 eV,接口温度 280 ℃;质量范围 *m/z* 35 ~ 550,离子源 EI 源,标准图库 NIST 05。

2.3 指纹图谱方法学考察

2.3.1 精密度考察 取 11 号样品,按 2.1 项下方法制备供试品溶液,精密吸取 1 μL,按 2.2 项下色谱条件,连续进样 6 次,记录其色谱图,考察 2,14,16,17,22,23 号色谱峰相对保留时间和相对峰面积的一致性。以 *t_R* 15.13 min 的 24 号峰为参照峰,计算各主要色谱峰相对保留时间和保留面积,结果表明,各主要色谱峰相对保留时间的 RSD 分别为 0.03,0.1,0.1,0.2,0.4,0.2,各主要色谱峰相对峰面积的 RSD 分别为 1.0,1.2,0.1,0.3,1.4,0.7,均 < 2%,表明仪器精密度较好,结果见表 1,2。

表 1 神农香菊挥发油指纹图谱方法学考察相对保留时间 RSD
Table 1 Methodological study of RSD of fingerprint relative retention time %

共有峰	精密度	重复性	稳定性
2	0.03	0.10	0.22
14	0.14	0.17	0.97
16	0.12	0.06	0.03
17	0.16	0.04	0.03
22	0.42	0.13	0.05
23	0.16	0.09	0.45

表 2 神农香菊挥发油指纹图谱方法学考察相对峰面积

Table 2 Methodological study of fingerprint relative peak area %

共有峰	精密度	重复性	稳定性
2	1.0	2.0	2.6
14	1.2	1.4	1.8
16	0.1	0.5	0.2
17	0.3	0.5	0.6
22	1.4	1.7	1.6
23	0.7	1.7	1.6

2.3.2 稳定性考察 取 11 号样品,按 2.1 项下方法制备供试品溶液,在供试品溶液制备后 0,2,4,8,16,24 h,精密吸取供试品溶液 1 μL,按 2.2 项下色谱条件,分别进样,记录其色谱图,以 *t_R* 15.13 min 为参照峰,考察 2,14,16,17,22,23 号色谱峰的相对保留时间和相对峰面积,结果相对保留时间的 RSD < 1.0%,主要共有峰相对峰面积的 RSD < 3.0%,说明该样品溶液在 24 h 内稳定,结果见表 1,2。

2.3.3 重复性考察 取 11 号样品,按 2.1 项下方法制备供试品溶液,精密吸取 1 μL,按 2.2 项下色谱条件,记录其色谱图,以 *t_R* 15.13 min 为参照峰,考察 2,14,16,17,22,23 号色谱峰相对保留时间和相对峰面积的一致性,结果表明主要色谱峰相对保留时间和峰面积均无明显变化,其相对保留时间的 RSD < 0.2%,主要共有峰相对峰面积的 RSD < 3.0%。说明该方法具有较好的重复性,结

果见表 1, 2。

2.4 GC-MS 指纹图谱的建立 按选定的 GC-MS 条件对 15 批次神农香菊挥发油进行分析, 测得所有供试品的 GC-MS 总离子流图; 再对所有组分质谱数据经计算机处理和 NIST 标准质谱图库检索鉴定, 初步确定神农香菊挥发性成分中化合物。根据神农香菊挥发性成分 GC-MS 总离子流图所绘出的峰数、峰保留时间和峰面积值等相关参数以及成分鉴定结果, 导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2004 A) 软件对 GC-MS 数据进行处理、分析, 建立神农香菊挥发油 GC-MS 指纹图谱共有模式, 见图 1。各批次神农香菊挥发油的总离子流图叠加, 见图 2。

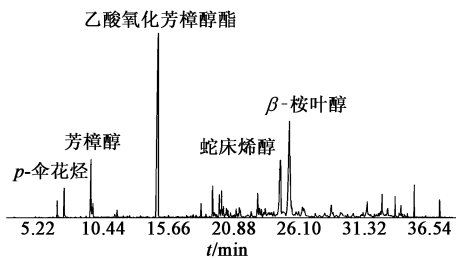


图 1 神农香菊挥发油 GC-MS 指纹谱共有模式
Fig.1 GC-MS common fingerprint of samples

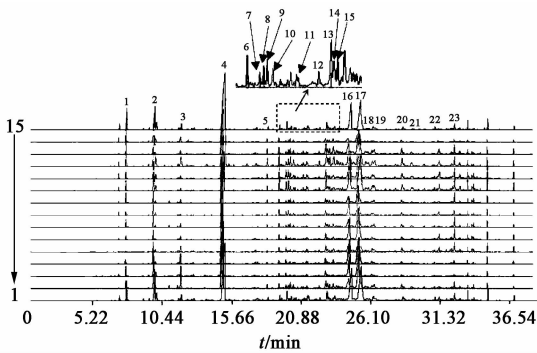


图 2 神农香菊挥发油指纹谱叠加
Fig.2 Overlapping plot of GC-MS fingerprints of *Dendranthema indicum* var. *aromaticum*

2.5 保留指数值测定 取正构烷烃混合对照品, 按照 2.2 项下的色谱条件进行 GC-MS 分析 (进样量 1 μL), 记录每个正构烷烃对照品出峰的保留时间, 采用 AMDIS 数据处理软件依照 Kovats 保留指数 (RI) 的计算公式来计算各挥发性成分的 RI 值。

2.6 指纹图谱的分析与评价

2.6.1 共有指纹峰的标定 结果显示神农香菊挥发油 GC-MS 指纹图谱中, 共有指纹峰有 23 个, 其中 4 号峰分离度好, 强度大且峰形稳定, 故选择为参照峰。与 4 号峰 (乙酸氧化芳樟醇酯) 相比, 其他 22 个共有指纹峰的相对保留时间依次为 0.51, 0.65,

0.79, 0.92, 1.27, 1.31, 1.32, 1.33, 1.35, 1.41, 1.46, 1.47, 1.51, 1.52, 1.63, 1.68, 1.74, 1.75, 1.88, 1.93, 2.06, 2.14。

2.6.2 共有指纹峰面积比 23 个共有指纹峰的总面积占 GC-MS 检测出的神农香菊挥发油总峰面积的 70% 以上。

2.6.3 神农香菊挥发油质谱分析结果 通过标准质谱图库 NIST05 检索, 并结合相关文献, 分析神农香菊挥发油指纹图谱中的共有峰成分并通过相同分析条件下正构烷烃对照品的出峰情况计算出各个峰的相对保留值, 共有峰成分分析结果见表 3。

表 3 神农香菊挥发油指纹图谱中的共有峰成分分析
Table 3 Componential analysis result of common peak from fingerprint of essential oil in *Dendranthema indicum* var. *aromaticum*

No.	t_R /min	RI	中文名称	英文名称
1	7.77	1 029	p-伞花烃	p-cymol
2	9.89	1 091	芳樟醇	linalool
3	11.89	1 179	氧化芳樟醇	linalool oxide
4	15.13	1 297	乙酸氧化芳樟醇酯	linalooloxide acetate
5	18.39	1 423	石竹烯	caryophyllene
6	19.27	1 458	金合欢烯	b-cis-farnesene
7	19.81	1 479	蛇床烯	g-selinene
8	19.98	1 485	α -姜黄烯	α -curcumene
9	20.12	1 491	桉叶烯	b-eudesmene
10	20.36	1 500	大根香叶烯 B	germacrene B
11	21.37	1 434	脱氢芳樟醇	trans-(-)-hotrienol
12	22.02	1 565	橙花叔醇	nerolidol
13	22.29	1 566	反式橙花叔醇	trans-nerolidol
14	22.81	1 584	桉油烯醇	(-)-spathulenol
15	22.94	1 588	氧化石竹烯	caryophyllene oxide
16	24.65	1 640	蛇床烯醇	selinenol
17	25.38	1 662	β -桉叶醇	β -eudesmol
18	26.3	1 689	甜没药醇	α -bisabolol
19	26.45	1 693	α -环氧化红没药烯	cis-Z- α -bisabolene epoxide
20	28.52	1 754	甜没药萜醇氧化物 A	(-)- α -bisaboloxide A
21	29.25	1 776	安息香酸苄酯	benzyl benzoate
22	31.24	1 875	1,3,3-薄荷属三烯	1,3,3-p-menthatriene
23	32.4	1 976	棕榈酸	n-hexadecanoic acid

注: 保留时间为综合 15 批次数据所取得的平均值 ($n = 15$)。

2.7 指纹图谱相似度的计算 将测定的 15 批次神农香菊 GC-MS 分析数据导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”, 建立神农香菊挥发油 GC-MS 指纹图谱共有模式, 并在此基础上比较谱峰整体间的相似性和差异性, 计算各个产地相应的图谱与对照图

谱的相似度。与共有模式比较,15 批次神农香菊的共有峰的相对保留时间、共有峰相对峰面积的差别均较小,相似度均 >0.90,结果见表 4。

表 4 15 批次样品指纹图谱相似度

Table 4 Similarities of 15 batches of samples compared with reference fingerprint

No.	批号	相似度
S1	2012-401	0.94
S2	2012-402	0.98
S3	2012-403	0.96
S4	2012-404	0.90
S5	2012-405	0.96
S6	2013-401	0.95
S7	2013-402	0.96
S8	2013-403	0.94
S9	2013-404	0.97
S10	2013-405	0.90
S11	2013-406	0.96
S12	2014-401	0.92
S13	2014-402	0.90
S14	2014-403	0.91
S15	2014-404	0.90

3 小结与讨论

本实验在样品制备、色谱条件等方面经过大量探索,采用 2010 年版《中国药典》挥发油提取方法提取了 15 批神农香菊挥发油,提取率在 0.62% ~ 1.06%。通过对色谱图的出峰数量、色谱峰的分离度等相关因素的反复考察,最终确定了目前所选用的测试条件。方法学考察结果表明,该方法建立的神农香菊挥发油指纹图谱准确可靠,这对从植物挥发性成分的视角来观察神农香菊药材的质量有显著的意义。

不同批次神农香菊中均含有乙酸氧化芳樟醇酯等 23 种成分,占药材挥发性成分的 70% 以上,具有突出的代表性,故以此 23 个特征性化合物作为共有峰建立神农香菊挥发油 GC-MS 指纹图谱。乙酸氧化芳樟醇酯含量高达 20%,为神农香菊挥发油中最为显著的指标,故后续方法学考察中以此作为参照峰,将其峰面积值设为 1,其他峰面积值等于该峰面积与参照峰面积的比值进行指纹图谱方法学考察。当然以上 23 种成分是否能完全揭示神农香菊药材的挥发性成分的化学组成,还需要考虑更多不同产地的神农香菊药材的影响,但由于其产地具有单一性,因此还有待进一步深入研究。

本实验通过系列方法学考察初步确立了神农香菊挥发性成分的 GC-MS 指纹图谱的分析方法,建立了神农香菊挥发油的 GC-MS 共有指纹图谱,该方法简单,可操作性强,可用于神农香菊药材的鉴别。且指纹图谱提供的信息较为丰富,可作为与其他同科属近缘种区别的标准模式,为神农香菊油的质量标准研究及其质量控制提供理论依据,也为后续神农香菊挥发性成分的谱效研究提供数据支持。

[参考文献]

[1] 卢金清,李峻. 神农香菊的挥发油化学成分[J]. 中国中药杂志,2002,27(8):41-42.

[2] 吴慧娟,黄杨名,陈科廷,等. 神农香菊全草精油的化学成分及抑菌机理研究[J]. 食品科学,2012,33(17):35-39.

[3] 刘朝霞,王宁,邹坤,等. 神农香菊精油抗菌与抗氧化活性研究(I)[J]. 三峡大学学报:自然科学版,2006,28(2):181-184.

[4] 文治瑞,杨卫灵,田红红,等. 淫羊藿挥发油的指纹图谱[J]. 中国实验方剂学杂志,2015,21(7):39-42.

[5] 朱琳. 花椒挥发油 GC-MS 指纹图谱及其成分的研究[D]. 成都:西南大学,2010.

[6] 周欣,李章万,王道平,等. GC-MS 法建立温莪术挥发油指纹图谱研究[J]. 中国中药杂志,2004,29(12):20-23.

[7] 盛菲亚,卢君蓉,彭伟,等. 香附炮制前后挥发油的 GC-MS 指纹图谱对比研究[J]. 中草药,2013,44(23):3321-3327.

[8] 甘秀海,梁志远,周欣,等. 冷水花挥发油 GC-MS 指纹图谱及抗菌活性[J]. 中国实验方剂学杂志,2015,21(17):63-66.

[9] 曾建红,莫炫永,戴平,等. 广西莪术挥发油抗肿瘤作用的谱效关系研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(13):91-94.

[10] 曾建红. 广西莪术挥发油 GC-MS 指纹图谱的构建及其谱效关系的研究[D]. 长沙:中南林业科技大学,2012.

[11] 张壮丽,赵宁,赵志鸿,等. 鱼腥草挥发油抗淋巴瘤细胞谱效关系[J]. 郑州大学学报:医学版,2015,50(3):378-381.

[12] 陈小露. 石菖蒲挥发油谱效关系的初步研究[D]. 广州:广州中医药大学,2015.

[13] 李生茂,曾滨阳,叶强,等. 砂仁挥发油抗炎活性谱效关系研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2015,21(9):133-136.

[责任编辑 顾雪竹]