

Kováts 保留指数在中药挥发油成分定性中的作用—青皮

王坚^{1,2}, 陈鸿平¹, 刘友平^{1*}, 刘荣¹, 樊丹青¹

(1. 成都中医药大学药学院, 中药资源系统研究与开发利用省部共建国家重点实验室培育基地, 成都 611137; 2. 重庆医科大学中医药学院, 重庆 400016)

[摘要] 目的: 以青皮为例, 研究在质谱定性的基础上, 保留指数在中药挥发油成分鉴定中的作用。方法: GC-MS 测定青皮挥发油及参比物(系列正构烷烃)的总离子流谱图。根据相关公式计算各待鉴定化合物的保留指数。应用 MS 与保留指数结合的方式对化合物定性。结果: 一些化合物具有几乎相同的质谱, 通过保留指数的差异却可以区分它们。结论: 保留指数在中药挥发油成分定性中发挥着重要作用。

[关键词] 保留指数; 青皮; 挥发油; 定性; 气相色谱质谱联用仪

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)14-0092-05

[doi] 10.11653/syfy2013140092

Study on the Role of Kováts Retention Index for the Identification of Components in Essential Oil from Chinese Materia Medica as Citri Reticulatae Pericarpium Viride

WANG Jian^{1,2}, CHEN Hong-ping¹, LIU You-ping^{1*}, LIU Rong¹, FAN Dan-qing¹

(1. State Key Lab Breeding Base of Systematic Research and Utilization on Chinese Materia Medica (CMM) Resources-Co-founded by Sichuan Province and Ministry of Science and Technology, College of CMM and pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Chengdu 611137, China; 2. College of TCM, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

[Abstract] **Objective:** To study the function of retention index (RI) on the qualitative results based on the MS qualitative outcome of volatile oil from Chinese material medica (CMM) as Citri Reticulatae Pericarpium Viride (CRPV). **Method:** The total ion chromatograms from essential oil of CRPV and referred materials as series *n*-alkanes were gotten by the GC-MS. The RIs of constituents in volatile oil were calculated by a related formula. The components were recognized by MS and RIs. **Result:** Some compounds have essentially identical mass spectra, while they can be discriminated by RIs. **Conclusion:** RI plays an important role in the identification of constituents in essential oil from CMM.

[Key words] retention index (RI); Citri Reticulatae Pericarpium Viride (CRPV); volatile oil; qualitative analysis; GC-MS

中药芸香科柑橘属植物的陈皮、青皮、枳实、枳壳、佛手等^[1]富含挥发油类成分。随着 GC-MS 的普

及, 现在对于中药挥发油成分的定性主要通过 MS 完成。但是仅仅依靠 MS 对化合物定性是不够的,

[收稿日期] 20121106(012)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81072991); 四川省教育厅自然科学重点项目(09ZA033)

[第一作者] 王坚, 博士研究生, 讲师, 从事中药质量标准及药效物质基础研究, Tel: 13882295108, E-mail: wj_2000_abc@163.com

[通讯作者] * 刘友平, 博士, 研究员, 从事中药质量标准及药效物质基础研究, Tel: 028-61800158, E-mail: lypedutcm@yahoo.cn

因为许多萜烯类化合物有着基本相同的质谱,这归因于它们相似的初始结构,或者离子化后多样化的裂解与重排。对于补充质谱数据而言,一些关于保留行为的知识是非常需要的^[2]。某一物质的保留行为是用该物质的保留值与标准物质的保留值之比来表示。测定相对保留值时,待测样品组份与参考物质都在同等的条件下层析。这其中最著名的就是 Kováts 提出的保留指数 (retention index, RI) 概念^[3-5]。保留指数是以一系列紧密相连的正构烷烃的测定结果做尺度来表述物质的保留行为。每个正构烷烃对应时间点的保留指数为 $100n$ (n 是正构烷烃的 C 原子数)。

由于中药或植物的挥发油成分复杂,要对其成分做一全面分析,GC-MS 测定时必须采用程序升温的方法。基于此, Van den Dool 与 Kratz^[6] 提出了一个用于计算程序升温保留指数 (temperature-programmed retention index, I_{TP}) 的公式(1)。

$$I_{TP} = 100n + 100 \left[\frac{T_x - T_n}{T_{(n+1)} - T_n} \right] \quad (1)$$

式中 T 代表保留温度, n 和 $n+1$ 分别表示正构烷烃的碳原子数。 x 表示待分析的成分, 其 T 值应介于 n 与 $n+1$ 的 T 值之间, 即 $T_n \leq T_x \leq T_{(n+1)}$ 。对于单一线性程序升温 (即保持恒定的升温速率), 可用相应的保留时间 t 代替 T ^[5,7-8]。本实验就是应用 t 计算各待鉴定化合物的保留指数。

I_{TP} 主要受固定相、化合物的分子结构影响, 此外还与其他一些操作参数有关 (如初始温度、升温速率、流量等)^[9-11]。GC 固定相根据其极性一般分为两类: 非极性的甲基聚硅氧烷 Methyl Siloxane 型与极性的 Carbowax 20M 型, 同一型色谱柱有着多种不同的商品规格。同一物质在不同类型色谱柱上测定的 I_{TP} 通常具有较大的差异, 但在同一类型不同规格色谱柱上测定的 I_{TP} 具有一定的稳定性, 且相对于极性柱, 非极性柱上测定的 I_{TP} 稳定性更高。如柱温对萜类在甲基聚硅氧烷上的 I_{TP} 影响小, 而在 Carbowax 20M 上影响明显, 在条件差别较大下测得的 I_{TP} 很易超过 50 单位^[11]。

中药挥发油成分在很多已发表的文献中仅采用 MS 一种方法定性, 这样得出的结论有时并不可靠。采用质谱与保留指数 2 种方法配合定性是非常需要的^[11]。在此, 本研究以青皮挥发油为例, 介绍在 MS 定性的基础上, 通过保留指数进一步对挥发油成分定性。

1 材料

Agilent 7890A/5975C GC-MS, 匹配—化学工作

站 MSD ChemStation E. 02. 01. 1177。质谱检索数据库 NIST08。C₈-C₂₀ 系列正构烷烃标准溶液 (mixture no. 04070) 购于 Fluka Chemika。正己烷为色谱纯, 无水硫酸钠为分析纯。青皮 *Citri Reticulatae Pericarpium Viride* 于 2011 年 8 月 15 日采于生长于重庆市璧山县健龙乡画眉村的 3 棵相邻、且具有相同树龄的植株。原植株经成都中医药大学药学院严铸云教授鉴定为大红袍红橘 *Citrus reticulata* ‘Dahongpao’。

2 方法

2.1 挥发油的提取 称取青皮 22.4 g, 粉碎后与约 10 倍量蒸馏水于 40 °C 时在挥发油提取器中溶胀 1 h, 后提取 3 ~ 4 h, 得挥发油 0.15 mL。挥发油于 4 °C 经无水硫酸钠脱水 24 h, 后置于冰箱中备用。

2.2 GC-MS 测定条件 非极性色谱柱 HP-5MS 5% Phenyl Methyl Siloxane (0.25 μm × 0.25 mm × 30 m), 进样口温度 280 °C, 分流比 20:1, 载气 He, 恒定流速 1 mL · min⁻¹, 进样量 1 μL, 样品浓度 10%, 正己烷溶解, 升温程序, 初始温度 60 °C, 保持 3 min, 以 4 °C · min⁻¹ 升温至 250 °C。

质谱条件: 电离方式 EI 源, 电子能量 70 eV, 离子源温度 230 °C, 全扫描, 扫描频率 2.29 scans · s⁻¹; 质量范围 m/z 30 ~ 350, 溶剂延迟 3 min。

2.3 保留指数的测定 取正构烷烃混合对照品, 按照 2.2 项下条件分析。根据公式(1)计算各待鉴定化合物的保留指数。

3 结果与分析

对青皮挥发油总离子流谱图 (图 1) 中峰面积排在前 40 位的峰进行分析。首先通过 Probability Based Matching algorithm (PBM, 基于匹配概率的算法) 将谱库检索报告导出, 分析各峰对应的匹配物, 再通过保留指数做进一步的分析。共鉴定了 30 个化合物, 具体结果见表 1。

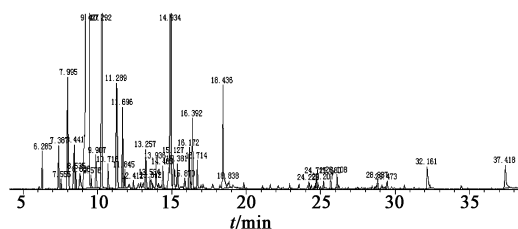


图 1 青皮挥发油总离子流谱图

从表 1 可看出, 通过 MS 可直接对一些峰定性, 如峰 1, 10, 11, 12, 13 等, 进一步比较各峰的 I_{TP} 与匹配化合物的 I 可再次确认之前的定性结果。

表 1 青皮挥发油中的主要成分

No.	t_R/min	I_{TP}	I	$\left \frac{I_{TP} - I}{I} \right \times 100\%$	匹配化合物	匹配度
1	6.285	933	931	0.21	α -pinene α -蒎烯	94
2	7.558	976	970	0.62	β -pinene β -蒎烯	91
			1036	5.79	β -terpinene β -萜品烯	91
			964	1.24	sabinen 桉烯	91
3	7.994	991	979	1.22	β -myrcene β -月桂烯	无
			968	2.38	2-thujene 2-崖柏烯	72
4	8.837	1018	1008	0.99	α -terpinene α -萜品烯	96
			996	2.21	2-carene 2-萜烯	97
			1018	0	(+)-4-carene (+)-4-萜烯	96
5	9.426	1033	1020	1.27	limonene 柠檬烯	91
			949	8.85	cyclohexene, 4-ethenyl-1,4-dimethyl-4-乙烯基-1,4-二甲基环己烯	90
6	9.579	1039	1024	1.46	β -cis-ocimene β -顺式罗勒烯	94
			1034	0.48	β -trans-ocimene β -反式罗勒烯	94
7	9.906	1049	1034	1.45	β -trans-ocimene β -反式罗勒烯	无
			1041	0.77	β -ocimene β -罗勒烯	97
			1024	2.44	β -cis-ocimene β -顺式罗勒烯	97
8	10.291	1059	1047	1.15	γ -terpinene γ -萜品烯	94
			1005	5.37	3-carene 3-萜烯	91
9	11.287	1089	1078	1.02	terpinolene 异松油烯	96
			1018	6.97	(+)-4-carene (+)-4-萜烯	93
10	11.694	1101	1081	1.85	linalool 芳樟醇	97
11	11.847	1106	1089	1.56	1,5,7-Octatrien-3-ol, 3,7-dimethyl-3,7-二甲基-1,5,7-辛三烯-3-醇	72
12	12.414	1122	1097	2.28	myrcenol 月桂烯醇	90
13	13.257	1146	1127	1.68	β -terpineol β -萜品醇	91
14	13.533	1154	1139	1.32	ocimene 罗勒烯醇	59
			928	24.35	cyclopropane, 1,1-dimethyl-2-(3-methyl-1,3-butadienyl)-1,1-二甲基-2-(3-甲基-1,3-丁二烯基)-环丙烷	87
15	13.613	1156	1137	1.67	2H-pyran, 3,6-dihydro-4-methyl-2-(2-methyl-1-propenyl)-3,6-二氢-4-甲基-2-(2-甲基-1-丙烯基)-2H-吡喃	86
16	14.406	1179	1161	1.55	terpinen-4-ol 萜品烯-4-醇	97
17	14.936	1192	1172	1.71	α -terpineol α -萜品醇	86
18	15.125	1199	1177	1.87	γ -terpineol γ -萜品醇	96
			907	32.19	2-bornene 2-菠烯	90
19	15.38	1207	1183	2.03	decanal 癸醛	93
20	15.867	1221	1207	1.16	cis-carveol 顺式香芹醇	95
21	16.39	1236	1215	1.73	methyl thymyl ether 百里香酚甲醚	93
22	16.718	1246	1220	2.13	carvone 香芹酮	78
23	18.433	1297	1266	2.45	thymol 百里香酚	94
			1332	2.63	3-methyl-4-isopropylphenol 3-甲基-4-异丙基苯酚	94
			1278	1.49	carvacrol 香芹酚	90

续表 1

No.	t_R /min	I_{TP}	I	$\left \frac{I_{TP} - I}{I} \right \times 100\%$	匹配化合物	匹配度
24	24.227	1 478	1 473	0.34	2-isopropenyl-4a,8-dimethyl-1,2,3,4,4a,5,6,7-octahydronaphthalene 2-异丙烯基-4a,8-二甲基-1,2,3,4,4a,5,6,7-八氢萘	94
			1 531	3.46	γ -selinene γ -蛇床烯	83
25	24.714	1 494	1 491	0.20	cadina-3,9-diene 杜松烷-3,9-二烯	99
			1 509	0.99	δ -selinene δ -蛇床烯	98
			1 440	3.75	cadinene 杜松烯	99
26	25.681	1 526	1 514	0.79	(+)- δ -cadinene(+)- δ -杜松烯	96
			1 491	2.35	cadina-3,9-diene 杜松烷-3,9-二烯	94
27	26.11	1 541	1 509	2.12	δ -selinene δ -蛇床烯	95
			1 481	4.05	naphthalene, 2,3,4,4a,5,6-hexahydro-1,4a-dimethyl-7-(1-methylethyl)-2,3,4,4a,5,6-六氢-1,4a-二甲基-7-(1-甲基)-萘	96
			1 440	7.01	cadinene 杜松烯	94
			1 413	9.06	β -maaliene β -橄榄烯	94
28	28.836	1 635	1 627	0.49	γ -eudesmol γ -桉叶醇	99
			1 440	13.54	cadinene 杜松烯	93
29	32.158	1 758	1 731	1.56	α -sinensal α -甜橙醛	94
30	37.414	1 968	1 942	1.34	n-hexadecanoic acid 正十六酸	98

注: I_{TP} 与 I 分别为本实验测得的与NIST提供的非极性柱上测得的程序升温保留指数,匹配度最大值为100,黑体显示的为最终的定性化合物。

但有的峰给出了2个或更多的高匹配度化合物,如峰2,4,5,6,7,8等。对于这些峰,仅仅依靠MS已很难准确的定性,但通过保留指数的比较却有可能准确的定性,兹举2例加以说明。

峰6对应的两个化合物分别是 β -顺式罗勒烯与 β -反式罗勒烯,峰7对应的两个化合物分别是 β -罗勒烯与 β -顺式罗勒烯。由于 β -罗勒烯只有一对同分异构体 β -顺式罗勒烯与 β -反式罗勒烯。因此,峰6与峰7应分别对应其中的一个异构体。但由于这两个异构体高度相似的化学结构,导致它们的质谱也几乎相同,仅仅依靠MS区分它们已不太可能,但通过比较两者的 I_{TP} 却可以区分它们。峰6与7对应的 I_{TP} 分别为1 039与1 049。而NIST提供的 β -顺式罗勒烯、 β -反式罗勒烯的 I 分别为1 024与1 034^[12],这表明 β -顺式罗勒烯先于 β -反式罗勒烯出峰。因此,推断峰6与7分别对应 β -顺式罗勒烯与 β -反式罗勒烯。

峰24对应2个高匹配度的化合物:2-异丙烯基-4a,8-二甲基-1,2,3,4,4a,5,6,7-八氢萘与 γ -蛇床烯。峰24对应的质谱与这2个化合物的参考谱图十分相似,仅仅依靠MS定性,结论并不可靠。但NIST提供的两者 I 分别为1 473与1 531,与峰24

对应的1 478比较,确定其对应的化合物为2-异丙烯基-4a,8-二甲基-1,2,3,4,4a,5,6,7-八氢萘。相关质谱见图2。

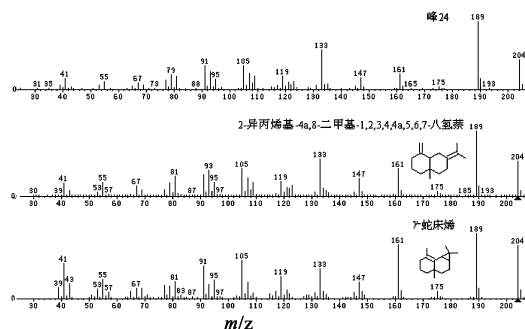


图2 峰24对应的质谱图及2-异丙烯基-4a,8-二甲基-1,2,3,4,4a,5,6,7-八氢萘、 γ -蛇床烯的参考谱图

峰3质谱检索报告给出的最佳匹配物是2-崖柏烯,但仔细分析峰3对应质谱与2-崖柏烯的参考谱图发现,两者并不匹配。两者的保留指数也有较大差异(991与968)。通过另一种检索方式NIST Search检索后发现,其对应的最佳匹配物是 β -月桂烯。通过细致分析两者的质谱图,确定两者是匹配的。并且两者的保留指数也相对接近(991与979)。各质谱图见图3。文献[13]亦从产于自贡、来源于大红袍红橘青皮挥发油中检测到 β -月桂烯,

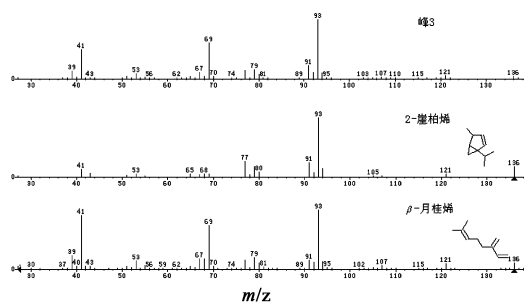


图 3 峰 3 对应的质谱图及 2-崖柏烯、 β -月桂烯的参考谱图

保留指数为 1 003。这进一步佐证了峰 3 定性结果的正确性。

表 1 定性结果的正确性绝大部分可进一步由参考文献[13-14]的报道佐证。

4 讨论

通过以上的分析可看出,一些峰对应的匹配物具有几乎相同的质谱,仅仅依靠质谱来对这些峰进行定性是不可行的。而在质谱分析的基础上,通过比较这些匹配物的 I 与对应峰的 I_{TP} ,却有可能对该峰准确的定性^[7]。被定性的峰不仅与定性化合物物有高度相似的质谱,同时也有高度相似的保留指数。从表 1 可看出,各峰的 I_{TP} 与定性化合物 I 之间的偏差均未超出 3%。若两者的偏差较大,即使质谱图十分相似,也应予以否定,如峰 14。由此可见,保留指数在中药挥发油成分定性中发挥着重要作用,具有很大的参考价值。对于中药挥发油成分的鉴定,应将 MS 与保留指数结合起来,保留指数和其他手段综合定性是气相色谱发展的重要趋势之一^[5,7-8,11,13-15]。当然对于某些峰,如果其与 2 个或多个匹配物的质谱与保留指数都比较相似,如本研究峰 4 对应的 α -蒎烯与 (+)-4-萜烯,峰 23 对应的百里香酚、3-甲基-4-异丙基苯酚、香荆芥酚,等。要对这些峰进行准确的定性,就必须应用对照品进行比对。

[参考文献]

[1] 南京中医药大学. 中药大辞典[M]. 2 版. 上海:上海科学技术出版社,2005.

[2] Davies N W. Gas chromatographic retention indices of monoterpenes and sesquiterpenes on methyl silicone and Carbowax 20M phases [J]. J Chromatogr, 1990, 503 (1):1.

[3] Kováts E. Gas-chromatographische Charakterisierung organischer Verbindungen Teil 1; Retentionsindices aliphatischer Halogenide, Alkohole, Aldehyde und Ketone [J]. Helv Chim Acta, 1958, 41 (7):1915.

[4] 张胜强,安登魁. Kováts 保留指数与药物分析[J]. 国外医学:药学分册,1981,8(2):104.

[5] 赵晨曦,梁逸曾,胡黔楠,等. 气相色谱保留指数定性方法研究进展[J]. 分析化学,2005,33(5):715.

[6] Van Den Dool H, Kratz P D. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography [J]. J Chromatogr, 1963, 11:463.

[7] 杨帅,杨文文,胡金芳,等. GC-MS 结合保留指数分析白花蛇舌草挥发性成分 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(9):93.

[8] 刘朋,徐琳琳,吕青涛,等. 顶空进样 GC-MS 结合保留指数分析补骨脂挥发性成分 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(10):66.

[9] 张嘉捷,陈吉平,张乐洋. 气相色谱保留指数通用数据库的研究(二) PEG 20M 柱保留指数的相互关系 [J]. 色谱, 1996, 14(4):239.

[10] 陈吉平,张嘉捷,王龙星,等. 气相色谱保留指数通用数据库的研究(三)不同柱温模式下保留指数的相互转换 [J]. 色谱, 1996, 14(5):323.

[11] 黄荣清. 气相色谱保留指数在中药挥发油鉴定中的应用 [J]. 药物分析杂志, 1998, 18(S1):232.

[12] Bendahou M, Muselli A, Grignon-Dubois M, et al. Antimicrobial activity and chemical composition of *Origanum glandulosum* Desf essential oil and extract obtained by microwave extraction; Comparison with hydrodistillation [J]. Food Chem, 2008, 106(1):132.

[13] Wang Y M, Yi L Z, Liang Y Z, et al. Comparative analysis of essential oil components in *Pericarpium Citri Reticulatae Viride* and *Pericarpium Citri Reticulatae* by GC-MS combined with chemometric resolution method [J]. J Pharmaceut Biomed Anal, 2008, 46(1):66.

[14] Yu L F, Li X R, Liu S Y, et al. Comparative analysis of volatile constituents in *Citrus Reticulata* Blanco using GC-MS and alternative moving window factor analysis [J]. J Sep Sci, 2009, 32(20):3457.

[15] 孙建勋,王金梅,杨飞,等. 贵州金丝桃挥发性成分的分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(14):115.

[责任编辑 顾雪竹]