

MC 顶空萃取-热解吸-GC/MS 法研究 香附指纹图谱



WU Xiao-wen

吴晓雯¹, 张俊梅², 潘再法¹, 王丽丽^{1*}

(1. 浙江工业大学 化学工程与材料学院, 浙江 杭州 310014;

2. 浙江普洛得邦制药有限公司, 浙江 东阳 322118)

摘要: 采用新型搅拌棒萃取器(MC)顶空萃取-热解吸-气相色谱/质谱(TD-GC/MS)方法分析香附中的挥发性成分,优化了MC萃取、解吸等条件,并对方法重现性进行考察,30个峰的相对峰面积的RSD均小于8.6%。继而测定了不同产地的香附样品,建立指纹图谱,标定44个共有峰,占总峰面积90%以上。并对图谱进行相似性评价及聚类分析,研究表明该法可为香附药材质量控制、产地选择提供理论依据。

关键词: 香附;挥发性成分;搅拌棒萃取器(MC);GC/MS;指纹图谱

中图分类号:TQ351;O658

文献标识码:A

文章编号:0253-2417(2012)01-0093-06

Establishment of *Cyperus rotundus* Tubers Fingerprints by Magic Chemisorber-thermal Desorption-GC/MS Method

WU Xiao-wen¹, ZHANG Jun-mei², PAN Zai-fa¹, WANG Li-li¹

(1. College of Chemical Engineering and Materials Science, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, China;

2. Zhejiang Apeloa Tospo Pharmaceutical Company Limited, Dongyang 322118, China)

Abstract: A novel solid-phase extraction element i. e. magic-chemisorber(MC) combined with thermal desorption (TD)-gas chromatography/mass spectrometry(GC/MS) was applied for the analysis of volatile component in *Cyperus rotundus* tubers from different growing areas. Conditions of the MC extraction and TD etc. were optimized. The obtained fingerprints of 12 samples were based on the relative peak areas of 44 peaks in each GC profiles, and RSDs of the relative peak areas were less than 8.6%. The results showed that it was a simple, rapid, and effective method for the quality control of *Cyperus rotundus* tubers.

Key words: *Cyperus rotundus* tubers; volatile components; magic-chemisorber; gas chromatography/mass spectrometry; fingerprints

香附,别名莎草根、香附子等,是莎草科植物莎草(*Cyperus rotundus* L.)的根茎。其成分比较复杂,除含有挥发油类外,还有糖类、生物碱、黄酮类等物质,其中挥发油起着主要的药效作用,具有抗菌、抗突变、抗遗传毒性等作用^[1]。对于香附挥发性成分的研究,目前主要是采用水蒸气蒸馏,溶剂提取,CO₂超临界萃取或加压流体萃取等前处理技术结合GC/MS进行分析^[2-4]。这些前处理方法大都费时繁琐、样品用量较大,故在对大量样品进行质量评价时,无法满足快速、简便、高效的分析要求。近年来得到快速发展的固相微萃取(SPME)技术集萃取、浓缩、进样于一体,非常便捷^[5],但是萃取头易饱和且易断裂。由于香附中的挥发性物质较多,SPME使用过程中极易被饱和,若取样量过小,又不能满足样品的代表性要求。Magic Chemisorber(MC)是由日本 Frontier Lab. 公司推出的新型大容量固相搅拌棒式萃取器,由于萃取容量大、灵敏度高,故特别适用于基质复杂的样品。本课题组已采用MC成功测定了溶液体系

收稿日期:2011-02-12

基金项目:浙江省重点科技创新团队基金(2011R09002-11);浙江省重中之重学科开放基金(200908)

作者简介:吴晓雯(1986-),女,浙江杭州人,硕士生,研究方向为色谱分析

* 通讯作者:王丽丽,博士生导师,主要从事色谱分析研究;E-mail:lili_wang@zjut.edu.cn。

中的微量成分,包括水中的微量除草剂及饮料中的防腐剂^[6-7]。Lee等^[8]采用MC测定了松叶中的挥发性成分。本课题组又运用MC顶空萃取-热解吸-气质联用技术(TD-GC/MS)测定了香附中挥发性成分^[9],且与SD-GC、SPME-GC法相比较,该法是一种灵敏、快速和有效的分析方法。本研究在此基础上,对MC萃取、解吸过程进行优化。在最佳条件下应用MC-TD-GC/MS技术分析不同产地的香附药材,建立香附挥发性成分GC/MS指纹图谱,并对图谱进行相似性评价及聚类分析。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

PY2020iD型双击式裂解器,日本Frontier Labs.公司;Magic Chemisorber,日本Frontier Labs.公司;Finnigan Trace DSQ,美国Thermo公司;CP-3800,美国Varian公司。

12个香附样品,产自浙江、安徽、山东,购买于浙江省杭州市。样品粉碎后,粒径约为124 μm,备用。

1.2 实验条件

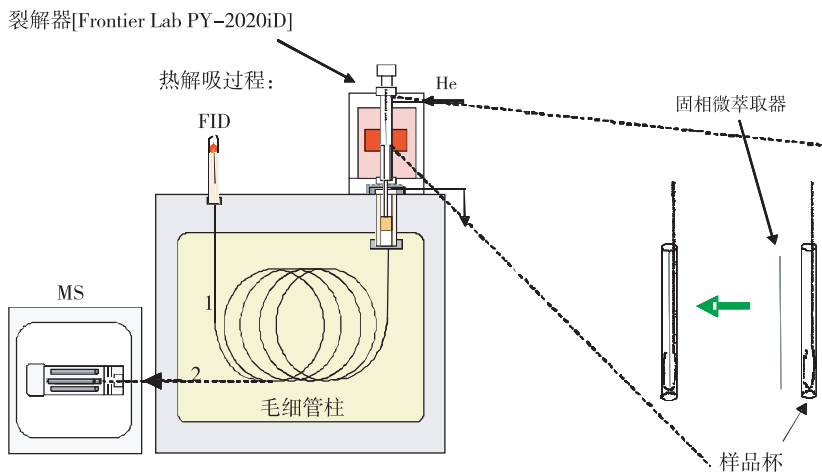
1.2.1 TD条件 裂解器温度以40 °C/min的速率由50 °C升到280 °C,保留10 min。

1.2.2 GC条件 采用不锈钢毛细管柱Ultra ALLOY-5(30 m×0.25 mm×0.25 μm,5%苯基聚二甲基硅氧烷);程序升温:从40 °C以10 °C/min升温到80 °C,再以2 °C/min升温到180 °C,最后以5 °C/min升到250 °C(保持5 min);进样口和检测器均为250 °C;载气为高纯N₂。使用FID检测器。

1.2.3 MS条件 高纯He;离子源:EI源,电离电压70 eV;离子源温度250 °C;传输线温度:250 °C;扫描范围40~500 u。

1.3 TD-GC实验步骤

先将装有固相微萃取器的样品杯固定到双击式裂解器手柄中,然后置于裂解器上。待裂解器温度达到所需的起始温度后,轻点手柄的收缩杆,使样品杯掉下置于炉芯,然后以实验所设定的升温速率进行热解吸。热解吸物质被载气He带到毛细管柱柱头冷凝,此时柱温为40 °C。待热解吸完成后,开始GC或GC/MS分析。TD-GC或TD-GC/MS装置可见下图。



2 结果与分析

2.1 MC-TD条件的选择

2.1.1 萃取条件的优化 MC萃取条件的优化包括萃取温度、萃取时间等。首先考察萃取温度的影响。5 mg样品,顶空瓶体积为8.4 mL。在不同的温度下(50~90 °C)进行萃取,以主要成分香附子烯、β-芹子烯、β-香附酮及α-香附酮的峰面积为指标进行选择。SD方法为中国药典(2005)的规定方法,故以MC萃取与SD得到的结果相近时的条件作为最佳萃取条件。如图1所示,在80 °C时,香附子烯、

β -芹子烯及 α -香附酮的MC萃取结果与SD萃取结果一致,且 β -香附酮也较接近,综合考虑,选择80℃作为顶空MC萃取温度。

其次考察萃取时间的影响。经过不同的萃取时间(30~120 min)萃取,结果见图2。由图可知,易挥发成分香附子烯与 β -芹子烯的相对峰面积随着萃取时间的增加而增加,45 min后峰面积不再增加,表明萃取已达到平衡。而低挥发成分 β -香附酮与 α -香附酮的峰面积随时间延长而不断增加,至120 min依然没有达到平衡。由于实际应用必须考虑时间成本,故选择易挥发成分的平衡时间45 min作为萃取时间。

2.1.2 热解吸条件的优化 MC顶空萃取后,采用释放气体分析法(EGA)确定热解吸条件。以40℃/min从50℃升至280℃,得到EGA曲线,如图3所示。吸着在MC上的挥发性成分从100℃开始脱附,至280℃(6 min)时达到最大后逐渐减少,16 min后曲线趋平,不再变化。即说明MC吸着的香附挥发性成分已脱附完全。因此确定16 min为最佳热解吸时间。

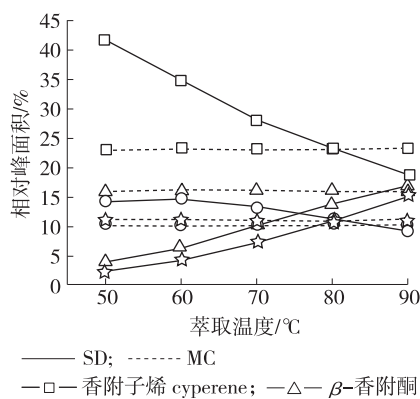


图1 萃取温度的影响

Fig.1 The effect of extraction temperature

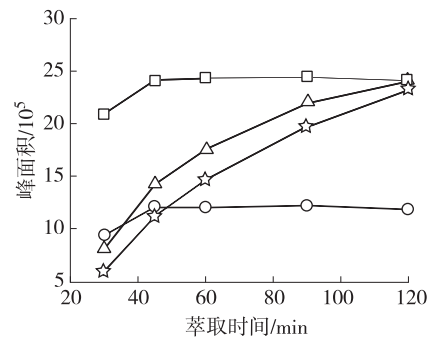


图2 萃取时间的影响

Fig.2 The effect of extraction time

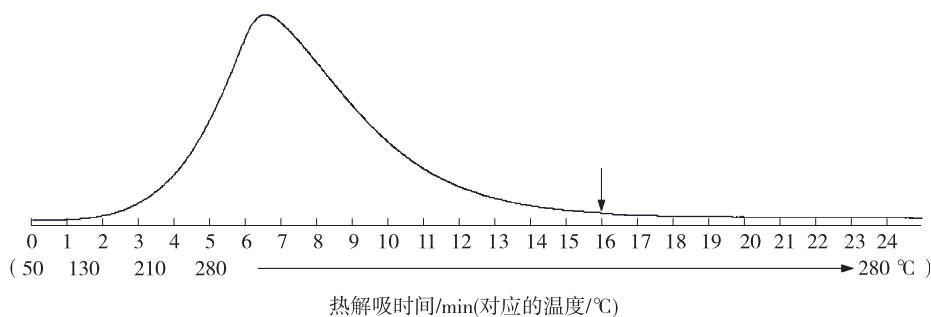


图3 香附挥发性成分 EGA 曲线图

Fig.3 EGA curve for essential oil from *Cyperus rotundus* tubers

2.2 MC-TD-GC/MS 法建立指纹图谱

按最佳条件采用MC顶空萃取-TD-GC/MS方法对香附挥发性成分进行分析。结果表明,香附挥发性成分较多,出峰集中在10~25 min,共分离得到56个色谱峰,鉴定出30个物质,占有峰面积的92.3%。重复测定6次,各峰相对峰面积的相对标准偏差(RSD)均小于8.6%,表明该法重现性较好。继而得到3个产地的12个香附样品的色谱叠加(图4)。

以浙江1号样(ZJ1)样品色谱图为例,指纹图谱具有明显特征:1)1~3号峰区,峰较少,丰度较低;2)4~17号峰区,峰度较强,出峰由稀至密。此区间化合物主要为倍半萜类;3)18~32号峰区,此区间色谱峰出峰密集、丰度较弱,且具有较好的分离度,是香附主要的指纹区。此区间以相对分子质量为220的倍半萜过氧化物为主;4)33~42号峰区,此区间化合物多为倍半萜酮类,分离度较差。整个色谱图中以9、13、15、18、24、27、33、37号峰为香附指纹图谱的主要特征峰。选择20.2 min的 β -香附酮为参照峰,此峰为所有样品共有,峰面积较大且稳定,相对峰面积在12%~13%之间。经过对挥发性成分

GC-MS总离子流图的解析、比较,选择保留时间在30 min以内的1~44号峰为共有峰。计算12组样品的共有峰与非共有峰的峰面积百分比,共有峰占峰面积百分数的90.5%~96.3%,符合共有峰总面积大于总峰面积的90%的技术要求^[10]。

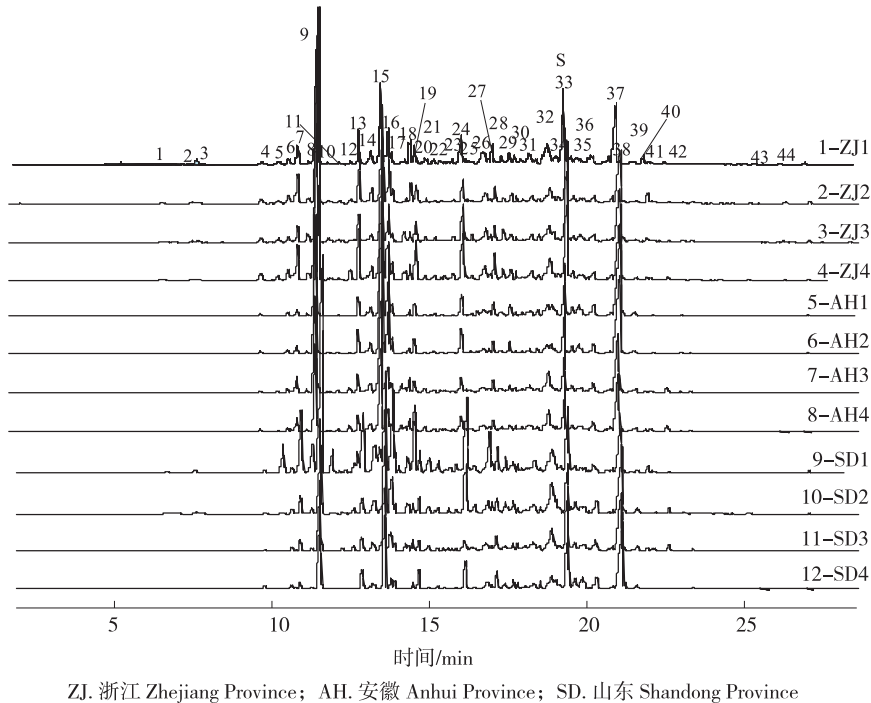


图4 12个香附样品的色谱叠加图

Fig. 4 The overlapping chromatograms of 12 samples of *Cyperus rotundus* tubers

2.3 相似度评价与聚类分析

表1为3个产地的12个香附样品的44个共有峰的GC含量。为从整体上反映不同产地香附中挥发性组分的变化情况,对指纹图谱进行了相似度评价。以表1中的44个共有峰作为指示,输入12个香附样品的峰面积含量,选择SPSS中的皮尔逊相关系数进行计算。结果表明,浙江、安徽和山东产的样品各自相似度分别为 ≥ 0.913 、 ≥ 0.964 和 ≥ 0.696 。由此推断,山东省的样品自身相似性较低^[11],与文献相符。

为了进一步揭示不同产地香附之间的关系,采用聚类分析统计方法对香附样品进行了分析。山东省的样品因其自身相似性较低,故不予考虑。选择了表1中ZJ1-4和AH1-4等8个样品的共有峰峰面积含量为原始矩阵,采用夹角余弦法计算,运用SPSS统计软件进行系统聚类分析。图5为样品的系统聚类树树图,直观地显示了样品逐步合并的过程,横坐标为临界值即为类间的距离,纵坐标为样品号。临界的值越小,表示谱图越相似。

表1 12个香附样品的44个共有峰的GC含量

Table 1 Relative percentages of 44 common peaks for 12 samples

峰号 peak No.	样品编号 sample No.											
	ZJ1	ZJ2	ZJ3	ZJ4	AH1	AH2	AH3	AH4	SD1	SD2	SD3	SD4
1	0.11	0.08	0.24	0.18	0.07	0.08	0.06	0.07	0.59	0.38	0.05	0.16
2	0.2	0.13	0.19	0.22	0.11	0.13	0.12	0.13	0.49	0.34	0.13	0.24
3	0.06	0.03	0.12	0.05	0.03	0.03	0.01	0.02	0.16	0.04	0.02	0.1
4	0.38	0.58	0.61	0.84	0.43	0.49	0.36	0.33	0.26	0.29	0.29	0.72
5	0.38	0.47	0.64	0.53	0.11	0.11	0.24	0.21	0.33	2.6	0.16	0.25
6	0.7	0.9	0.64	0.84	0.7	0.75	0.59	0.56	0.5	0.38	0.54	0.75
7	2.98	4.47	2.27	3.49	1.25	1.36	2.91	2.54	2.57	6.36	2.12	1.12
8	0.46	0.48	1.22	0.46	0.31	0.46	0.49	0.44	0.7	2.95	0.41	0.4
9	20.16	27.93	18.35	31.1	15.73	17.88	17.94	16.35	14.02	22.16	13.82	16.09

续表 1

峰号 peak No.	样品编号 sample No.											
	ZJ1	ZJ2	ZJ3	ZJ4	AH1	AH2	AH3	AH4	SD1	SD2	SD3	SD4
10	0.17	0.2	0.36	0.06	0.09	0.21	0.09	0.09	0.14	1.64	0.09	0.03
11	0.26	0.26	0.28	0.12	0.18	0.17	0.36	0.32	0.21	0.22	0.39	0.16
12	0.41	0.43	0.16	0.91	0.08	0.17	1.15	1.03	0.78	0.89	0.83	0.07
13	3.81	5.18	3.28	4.33	2.42	2.79	2.83	2.51	1.88	3.93	2.14	2.57
14	3	3.03	1.61	1.77	2.29	2.69	3.08	2.77	3.13	2.1	2.49	1.51
15	10.05	12.05	13.27	11.68	21.96	24.59	17.11	15.28	15.86	7.27	12.2	16.28
16	3.9	4.15	4.33	3.8	6.13	7.89	4.96	4.39	5.57	5.84	3.83	1.03
17	0.73	0.77	0.62	0.85	0.94	1.02	0.84	0.75	0.72	0.45	0.58	0.73
18	2.47	1.88	1.02	0.91	0.63	0.61	1.9	1.73	1.03	4.9	1.68	0.84
19	1.7	1.44	2.36	2.92	1.45	1.47	1.44	1.37	1.94	0.89	1.28	2.36
20	0.53	0.4	0.67	0.35	0.25	0.21	0.64	0.59	0.93	0.96	0.55	0.29
21	0.34	0.24	0.36	0.38	0.24	0.23	0.3	0.29	0.41	0.77	0.32	0.31
22	0.39	0.28	0.04	0.12	0.34	0.33	0.25	0.24	0.5	0.12	0.29	0.46
23	0.36	0.26	0.45	0.36	0.16	0.18	0.18	0.19	0.43	0.47	0.18	0.22
24	3.8	2.77	6.05	4.8	3.15	3.24	2.56	2.52	9.19	7.81	1.79	4.25
25	0.21	0.17	0.13	0.11	0.11	0.11	0.18	0.16	0.22	0.12	0.17	0.12
26	2.15	1.54	2.08	1.65	0.9	0.81	1.7	1.65	1.98	3.26	1.82	1.35
27	2.17	1.58	1.82	1.9	1.63	1.46	1.85	1.8	1.64	1.68	2.25	2.22
28	0.78	0.53	1.76	0.86	0.68	0.62	0.64	0.62	1.65	1.15	0.67	0.81
29	1.28	0.91	0.79	0.8	1.61	1.42	1.14	1.14	1.62	0.97	1.03	1.21
30	0.82	0.55	0.51	0.54	0.49	0.4	0.84	0.81	0.49	0.39	1.02	0.66
31	1.33	0.91	1.03	1.05	0.84	0.81	1.78	1.72	1.84	0.99	1.94	0.94
32	0.53	0.4	0.78	0.4	0.89	0.8	0.55	0.52	0.84	0.18	0.63	1.11
33	12.07	8.66	12.79	8.6	8.93	6.85	10.62	10.35	7.6	6.29	13.83	12.75
34	0.8	0.64	0.62	0.54	1.09	0.9	1.06	1.04	1.02	0.34	1.19	1.26
35	1.61	1.26	1.47	0.97	2.31	1.76	2.11	2.1	2.25	0.83	2.32	2.32
36	0.89	0.65	0.32	0.39	0.31	0.39	0.49	0.51	0.31	0.35	0.65	0.49
37	9.68	7.74	9.57	5.94	19.19	15.09	13.5	13.14	13.69	4.18	14.81	18.03
38	0.29	0.21	0.52	0.19	0.25	0.18	0.23	0.24	0.09	0.14	0.32	0.48
39	0.87	0.66	0.73	0.57	1.13	0.85	1.35	1.32	1.38	0.43	1.46	1.13
40	0.97	0.97	0.36	0.26	0.03	0.01	0.21	0.2	0.02	0.46	0.29	0.04
41	0.23	0.15	0.07	0.33	0.01	0.06	1.03	1.02	0.81	0.11	1.14	0.05
42	0.19	0.14	0.14	0.13	0.12	0.1	0.2	0.21	0.11	0.06	0.25	0.2
43	0.18	0.16	0.24	0.03	0.02	0.02	0.05	0.05	0.01	0.04	0.07	0.02
44	0.31	0.24	0.25	0.06	0.38	0.28	0.08	0.08	0.05	0.2	0.1	0.07

由图 5 可知,当临界值在 8 左右,来源于安徽的 4 个样品聚为一类;当临界值在 13 左右时,来源为浙江的 4 个样品聚为一类;两个产地的样品在临界值在 25 时又聚为一类。安徽省的香附样品与浙江省的样品能通过系统聚类法进行归类,表明了样品在地域上的差别。

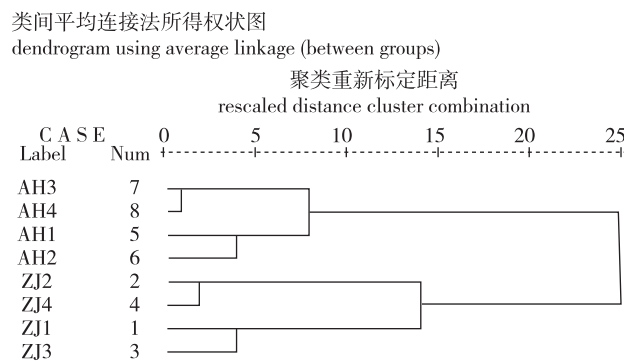


图 5 香附样品系统聚类树形图

Fig. 5 Hierarchical cluster analysis of *Cyperus rotundus* tubers samples

3 结论

运用 MC 顶空萃取-TD-GC/MS 法分析香附中的挥发性成分,对 MC 萃取条件、解吸条件及方法重现性等进行了考察。在最佳条件下测定不同产地的香附样品,建立了指纹谱图。标定了 44 个共有峰,占总峰面积 90 % 以上。对 3 个产地的 12 个样品香附进行相似度研究,浙江省相似度 ≥ 0.913 、安徽省 ≥ 0.964 ,并能通过聚类分析进行产地聚类,而山东省由于自身相似度较低,未能聚类^[11]。

参考文献:

- [1] 黄险峰,彭国平. 香附的化学成分及药理研究进展[J]. 中药材,2003,26(1):66-68.
- [2] 金晶,莱亚玲,赵钟祥,等. 香附挥发油提取工艺及主要成分的研究[J]. 中药材,2006,29(5):490-492.
- [3] 林晓珊,吴惠勤,黄芳. 香附挥发油的提取和 GC/MS 分析[J]. 质谱学报,2006,27(1):40-44.
- [4] 冯毅凡,郭晓玲,孟青. 香附超临界 CO₂ 萃取物化学成分分析[J]. 中药材,2006,29(3):232-235.
- [5] 叶冲,毛寒冰,何军,等. 顶空固相微萃取法分析刺木秋树杆和树皮中挥发油的化学成分[J]. 生物质化学工程,2010,44(6):32-35.
- [6] WANG LI-LI, HOSAKA A, WATANABE C. Development of a novel solid-phase extraction element for thermal desorption gas chromatography analysis[J]. Journal of Chromatography A, 2004, 1035: 277-279.
- [7] WANG LI-LI, ZHANG XIAO, WANG YI-PING. Simultaneous determination of preservatives in soft drinks, yogurts and sauces by a novel solid-phase extraction element and thermal desorption-gas chromatography[J]. Anal Chim Acta, 2006, 577: 62-67.
- [8] LEE H J, LEE C G, KWAG J J. Determination of volatile components of pine needles from *Pinus densiflora* S. using solid phase trapping extraction-gas chromatography-mass spectrometry[J]. Chem Anal (Warsaw), 2007, 52(3): 411-422.
- [9] 张俊梅, 张晓, 王丽, 等. MC 萃取热脱附气相色谱测定香附中挥发性成分[C]//浙江省第三届分析测试学术报告会论文集. 杭州: [出版者不详], 2007: 21-24.
- [10] 国家药品监督管理局. 中药注射剂指纹图谱研究的技术要求(暂行)[J]. 中成药, 2000, 22(10): 671-672.
- [11] 周凤琴. 山东不同产地香附的鉴别[J]. 中药材, 1996, 3: 119-121.