

薏苡仁油融合指纹图谱研究

崔媛¹, 王小明¹, 杨勇², 容蓉¹, 巩丽丽³, 蒋海强^{3*}, 韩冰冰²

1. 山东中医药大学药学院, 山东 济南 250355

2. 山东中医药大学基础医学院, 山东 济南 250355

3. 山东中医药大学 实验中心, 山东 济南 250355

摘要: 目的 建立薏苡仁油的融合指纹图谱。方法 薏苡仁油经气相色谱-质谱联用(GC-MS)和高效液相色谱-蒸发光散射(HPLC-ELSD)检测, 2种分析方法所得数据进行峰面积标准化处理, 运用中药色谱指纹图谱相似度评价软件进行指纹图谱融合。结果 薏苡仁融合指纹谱获得21个共有峰, GC-MS技术鉴定出13种脂肪酸酯类成分; HPLC-ELSD法检测部分得到8个共有峰。结论 融合指纹图谱的整体性好, 信息量大, 结合质谱技术部分消除了单一测定方法指纹图谱的模糊性, 为中药质量控制研究提供了一定的参考。

关键词: 薏苡仁油; 融合指纹图谱; 气相色谱-质谱联用; 高效液相色谱-蒸发光散射检测器; 脂肪酸酯

中图分类号: R286.02 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2014)12-1698-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.12.008

Research on fusion-fingerprint of *Coicis Semen* oil

CUI Yuan¹, WANG Xiao-ming¹, YANG Yong², RONG Rong¹, GONG Li-li³, JIANG Hai-qiang³, HAN Bing-bing²

1. School of Pharmaceutical Sciences, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China

2. School of Basic Medical Sciences, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China

3. Experimental Center of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China

Abstract: Objective To establish the fusion-fingerprint of *Coicis Semen* oil. **Methods** The *Coicis Semen* oil was analyzed by GC-MS and HPLC-ELSD, and the fusion-fingerprint was originated from the Computer Aided Similarity Evaluation software based on the normalized data acquired by the above two methods. **Results** Twenty-one common peaks existed in the fusion-fingerprint of which there were 13 kinds of aliphatic esters detected by GC-MS and 8 kinds of triglyceride ingredients detected by HPLC-ELSD. **Conclusion** The fusion-fingerprint established on GC-MS combined with HPLC-ELSD could provide integrity and more information for the quality control of Chinese materia medica.

Key words: *Coicis Semen* oil; fusion-fingerprint; GC-MS; HPLC-ELSD; aliphatic esters

薏苡仁性微寒、味甘淡, 具有利水消肿、健脾祛湿、清热排脓功效, 为禾本科植物薏苡 *Coix lachryma-jobi* L. var. *mayuen* (Roman.) Stapf 的干燥成熟种仁^[1]。近年研究发现薏苡仁油主要的活性成分甘油三酯类具有很强的抗肿瘤作用, 其中以油酸和亚油酸的量居高^[2], 还含有抗癌活性很强的奇数碳链脂肪酸^[3]。国内对薏苡仁的开发利用极为重视, 目前对薏苡仁油 GC 和 HPLC 指纹图谱研究的文献

较少。本实验采用气相色谱-质谱联用(GC-MS)和高效液相色谱-蒸发光散射(HPLC-ELSD)测定方法, 建立薏苡仁油融合指纹图谱, 从而对薏苡仁油物质基础信息有更清晰完整的认识, 为建立薏苡仁油的质量控制方法提供依据, 从方法学上为中药质量控制研究提供参考。

1 仪器与材料

Agilent 1200 型高效液相色谱仪、6980N—5975

收稿日期: 2014-01-23

基金项目: 国家重点基础研究发展计划“973”课题(2013CB531803)

作者简介: 崔媛(1990—), 女, 山东济南人, 2013级硕士研究生, 研究方向为中药及复方活性成分与质量控制研究。

Tel: 15339955773 E-mail: c651652359y@163.com

*通信作者 蒋海强(1982—), 男, 山东青州人, 副教授, 研究方向为中药及复方活性成分与质量控制研究。

Tel: 15966050664 E-mail: jhq12723@163.com

B 型气相色谱-质谱联用仪, 美国 Agilent 公司; Alltech ELSD 2000 型蒸发光散射检测器, 美国奥泰公司; AG—40 型无油空气压缩机, 山东省化工研究所; Mettler AE240 电子天平, 瑞士梅特勒公司; KQ—250E 型超声波清洗器, 昆山市超声仪器有限公司; HC—100 型高速多功能粉碎机, 浙江金山机械制造公司。

薏苡仁药材购自不同产地: 广西, 批号 20130205(S1)、20130819(S2); 贵州, 批号 20130201(S3)、20130901(S4); 山东, 批号 20130101(S5)、20130805(S6); 经山东中医药大学周凤琴教授鉴定, 为禾本科薏苡属植物薏苡 *Coix lachryma-jobi* L. var. *mayuen* (Roman.) Stapf 的干燥成熟种仁。甘油三油酸酯对照品(批号 111692-201303)购自中国食品药品检定研究院。乙腈、二氯甲烷均为色谱纯, 丙酮、甲醇、浓硫酸、醋酸乙酯均为分析纯, 天津市科密欧化学试剂有限公司。

2 方法

2.1 样品的制备

2.1.1 薏苡仁油的制备 薏苡仁药材 50 g 粉碎过 60 目筛, 精密称定, 丙酮回流提取 2 h, 重复提取 3 次, 滤过, 合并浓缩得薏苡仁油。

2.1.2 GC-MS 供试样品的制备 取薏苡仁油适量, 按 10 mL/g 加入浓硫酸-甲醇(2:98)混合液, 70 °C 回流 1 h, 冷却, 10 mL 醋酸乙酯萃取, 萃取液无水 Na_2SO_4 干燥, 以 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 作为 GC-MS 供试品溶液。

2.1.3 HPLC-ELSD 供试样品的制备 精密称取 20 mg 薏苡仁油, 以乙腈-二氯甲烷(65:35)定容, 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 作为 HPLC-ELSD 供试品溶液^[1]。

2.1.4 对照品溶液的制备 取甘油三油酸酯对照品适量, 精密称定, 加流动相制成含甘油三油酸酯 0.14 mg/mL 的溶液, 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 作为对照品溶液^[4]。

2.2 GC-MS 分析条件

色谱柱为 HP-5 MS (30 m×250 μm , 0.25 μm), 美国 Agilent 公司; 载气为氦气, 体积流量为 1.0 mL/min; 前进样口温度 250 °C, 接口温度 280 °C; 初始温度 180 °C, 保持 20 min, 平衡时间为 1 min, 以 5 °C/min 程序升温至 230 °C 保持 5 min; 进样量 0.2 μL ; 分流比 10:1。质谱条件: 标准谱图调谐; 电离方式 EI, 电子能量 70 eV; 离子源温度: 230 °C;

四级杆温度: 150 °C; 数据采集扫描模式: 全扫描; 质量范围 m/z : 50~550。

2.3 HPLC-ELSD 分析条件

色谱柱为 Eclipse XDB-C₁₈ (150 mm×4.6 mm, 5 μm), 美国 Agilent 公司; 流动相为乙腈-二氯甲烷(65:35); 柱温 25 °C; 体积流量 1 mL/min; 进样量 30 μL 。蒸发光散射检测器参数: 漂移管温度为 70 °C; 载气体积流量为 2 L/min^[1]。

2.4 指纹图谱数据融合方法

按照“2.2”、“2.3”项下条件分别测定不同薏苡仁油样品, 对所得色谱数据经峰面积归一化处理, 导出为 txt 文档。样品的 GC 部分和 HPLC 部分的数据经 Microsoft Office Excel 2003 软件融合, 融合数据导入国家药典委员会“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”, 得到薏苡仁油融合指纹图谱。

2.5 方法学考察^[4-5]

2.5.1 精密度试验 取贵州产地同一批次药材, 参照“2.1”~“2.4”项下方法制备样品、分析、融合, 平行 6 次, 所得融合指纹图谱各共有峰的相对保留时间 RSD 均低于 1.0%, 相对峰面积 RSD 低于 5.0%, 说明方法的精密度良好。

2.5.2 重复性试验 精密称取贵州产地同一批次薏苡仁生药 6 份, 参照“2.1”~“2.4”项下方法制备样品、分析、融合, 计算各共有峰的相对保留时间 RSD 均低于 1.0%, 相对峰面积 RSD 基本低于 5.0%, 说明方法重复性良好。

2.5.3 稳定性试验 取贵州产地同一批次药材, 分别制备样品, 按照“2.2”、“2.3”项下方法分别于 0、2、4、8、12、24 h 进样, 所得数据按“2.4”项下方法进行融合处理, 计算各共有峰相对保留时间的 RSD 均低于 3.0%, 相对峰面积 RSD 均低于 5%, 表明该方法处理的供试品溶液在 24 h 内基本稳定。

3 结果与分析

3.1 薏苡仁油脂肪酸类成分分析

按照“2.1.2”项下条件制备供试液, 按照“2.2”项下的条件进行 GC-MS 分析, 所得薏苡仁油甲酯化 GC-MS 总离子流图见图 1。图 1 中 13 个共有峰代表的脂肪酸类成分经 NIST2008 数据库检索并结合质谱鉴定, 主要化合物包括: 棕榈酸甲酯、(Z, Z)-9, 12-亚油酸甲酯、8-十八烯酸甲酯、硬脂酸乙酯、十八烯酸乙酯、顺-11-二十烯酸甲酯, 见表 1。

3.2 薏苡仁油中甘油三酯类成分分析

融合指纹图谱的 HPLC-ELSD 分析薏苡仁油的

甘油三酯类组分检测到8个峰,样品与对照品三油酸甘油酯色谱图见图2。在相同色谱条件下,以对照品(S)为标定,参照国家药典委员会公布的康

莱特注射液质量标准、注射用薏苡仁油质量标准^[6]及文献报道^[7-8]色谱峰出峰顺序,得到一致的薏苡仁油 HPLC-ELSD 色谱图,推断其中1~8号色谱峰依次为三亚油酸甘油酯、二亚油酸油酸甘油酯、棕榈酸二亚油酸甘油酯、二油酸亚油酸甘油酯、棕榈酸亚油酸油酸甘油酯、二棕榈酸亚油酸甘油酯、三油酸甘油酯、棕榈酸二油酸甘油酯。

3.3 薏苡仁油融合指纹图谱的建立

按照“2.4”项下方法数据归一化后,按照前半部分是 GC 指纹图谱的数据,后半部分为 HPLC 指纹图谱的数据,经基线校正,得到不同产地薏苡仁油融合指纹图谱,融合图谱中 t_R 0~35 min 为 GC-MS 检测图谱, t_R 35 min 以后为 HPLC-ELSD 检测图谱,结果见图3,合并“3.1”与“3.2”项下分析所得化合物结果,共指认21个共有峰的结构,结果见表1。

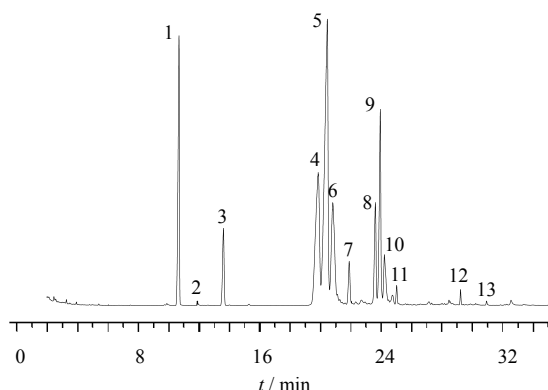


图1 薏苡仁油甲酯化 GC-MS 总离子流图

Fig. 1 GC-MS total ions chromatogram of methylesterification of *Coicis Semen* oil

表1 薏苡仁油融合指纹图谱的共有峰鉴定

Table 1 Identification of common peaks of fusion-fingerprint of *Coicis Semen* oil

峰号	化合物名称	分子式	M_W	t_R / min	峰号	化合物名称	分子式	M_W	t_R / min
1	棕榈酸甲酯	$C_{17}H_{34}O_2$	270	10.73	12	二十烷酸甲酯	$C_{21}H_{42}O_2$	326	29.28
2	棕榈酸	$C_{16}H_{32}O_2$	256	12.00	13	19-甲基-二十烷酸甲酯	$C_{22}H_{44}O_2$	340	30.99
3	棕榈酸乙酯	$C_{18}H_{36}O_2$	284	13.68	14	三亚油酸甘油酯	$C_{57}H_{98}O_6$	878	47.99
4	(Z, Z)-9, 12-亚油酸甲酯	$C_{19}H_{34}O_2$	294	19.80	15	二亚油酸油酸甘油酯	$C_{57}H_{100}O_6$	880	52.02
5	(E)-9-十八烯酸甲酯	$C_{19}H_{36}O_2$	296	20.33	16	棕榈酸二亚油酸甘油酯	$C_{55}H_{98}O_6$	854	54.13
6	8-十八烯酸甲酯	$C_{19}H_{36}O_2$	296	20.73	17	亚油酸二油酸甘油酯	$C_{57}H_{102}O_6$	882	58.21
7	硬脂酸甲酯	$C_{19}H_{38}O_2$	298	21.94	18	棕榈酸亚油酸油酸甘油酯	$C_{55}H_{100}O_6$	856	60.87
8	9, 12-亚油酸乙酯	$C_{20}H_{36}O_2$	308	23.64	19	二棕榈酸亚油酸甘油酯	$C_{53}H_{98}O_6$	830	62.79
9	十八烯酸乙酯	$C_{20}H_{38}O_2$	310	23.93	20	三油酸甘油酯	$C_{57}H_{104}O_6$	884	67.56
10	硬脂酸乙酯	$C_{20}H_{40}O_2$	312	25.07	21	棕榈酸二油酸甘油酯	$C_{55}H_{102}O_6$	858	71.09
11	顺-11-二十烯酸甲酯	$C_{21}H_{40}O_2$	324	25.51					

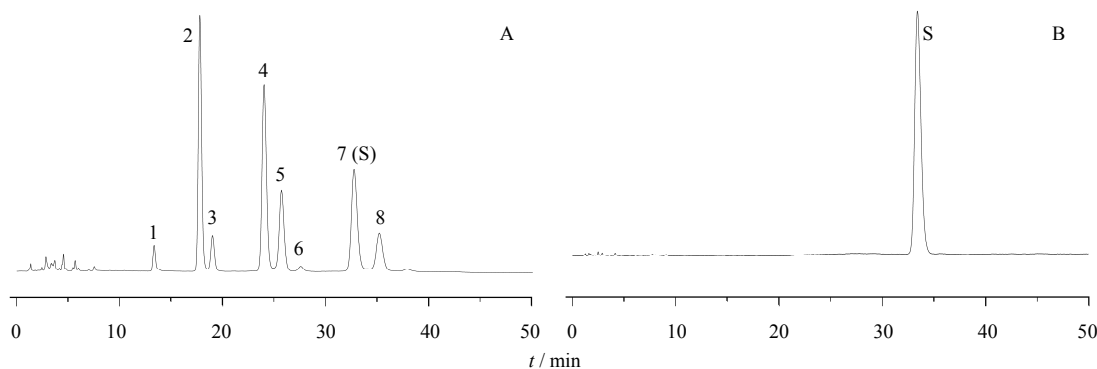


图2 薏苡仁油样品 (A) 和甘油三油酸酯对照品 (B) 的 HPLC-ELSD 色谱图

Fig. 2 HPLC-ELSD chromatograms of *Coicis Semen* oil sample (A) and triglyceride reference substance (B)

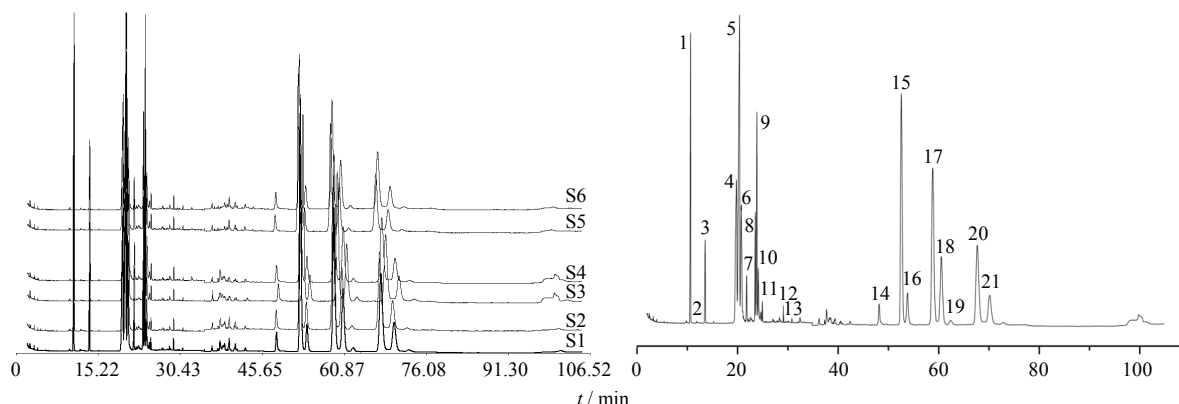


图3 薏苡仁油融合指纹图谱 (A) 及其共有模式图 (B)

Fig. 3 Fusion-fingerprint (A) and common pattern in fusion-fingerprint (B) of *Coicis Semen* oil

4 讨论

由于中药药材成分复杂, 现行的各种单一测定方法给出信息少, 单一色谱技术进行所有药材的指纹图谱分析, 整体性较差, 模糊性较强^[9-10]。本实验建立的 GC-MS 与 HPLC-ELSD 采集数据联合表达的融合指纹图谱方法, 将气相色谱指纹图谱与高效液相色谱指纹图谱的数据信号进行简单串联和集成, 即 GC-MS 指纹图谱的 0~35 min 和 HPLC-ELSD 指纹图谱 35 min 以后的色谱图进行融合, 使 2 种检测手段下的指纹图谱合而为一, 简单易行, 所得图谱直观清楚, 包含丰富的化学成分信息, 特征地表达中药组分的物质基础。

参考文献

[1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
[2] 李大鹏, 黄洁敏, 苏维埃, 等. 薏苡仁脂的化学成分分析 [J]. 中药新药与临床药理, 1990, 10(2): 99-101.
[3] 于飞. 薏苡仁提取物抗肿瘤新靶点及降血脂抗氧化活性研究 [D]. 天津: 天津大学, 2010.

[4] 易智彪, 薄雯映, 许冬瑾, 等. 太子参 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 中草药, 2009, 40(8): 1308-1310.
[5] 咎俊峰, 徐斌, 刘军锋, 等. 茯苓三萜成分 RP-HPLC-ELSD 指纹图谱研究 [J]. 中草药, 2012, 43(5): 895-900.
[6] 国家药典委员会中药标准处. 关于康莱特注射液、注射用薏苡仁油修订质量标准的公示 [S/OL]. <http://www.chp.org.cn/cms/newscenter/publicity/000304.html>. 2013-02-19.
[7] 李楠, 卢亚婷, 宋娟娜, 等. HPLC 法测定薏苡仁油中甘油三油酸酯的含量 [J]. 陕西科技大学学报: 自然科学版, 2013(4): 101-104.
[8] 陈勇, 陈碧莲, 何云珍, 等. 薏苡仁药材指纹图谱的研究与应用 [J]. 药学实践杂志, 2003, 21(6): 357-359.
[9] 罗国安, 梁琼麟, 王义明, 等. 中药指纹图谱—质量评价、质量控制与新药研发 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2009.
[10] 任培培, 孙国祥, 孙丽娜. 附子理中丸多波长融合 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 药物分析杂志, 2009, 29(3): 411-415.