

GC-MS 结合化学计量学解析法分析臭冷杉针叶挥发油成分

任恒鑫¹, 苏 瑞², 张舒婷¹, 宗希明¹, 方洪壮^{1*}

1. 佳木斯大学药学院, 黑龙江 佳木斯 154007

2. 哈尔滨第一医院, 黑龙江 哈尔滨 150010

摘要: 目的 分析臭冷杉 *Abies nephrolepis* 针叶挥发油中化学成分。方法 利用 GC-MS 联用技术进行分离检测, 通过直观推导式演进特征投影 (HELP) 法对重叠峰进行解析, 并结合程序升温保留指数 (PTRI) 进行辅助定性分析, 采用峰面积归一化法对各组分进行定量分析。结果 共分辨出 72 个色谱峰, 鉴定了其中 63 个组分, 占臭冷杉挥发油化学成分总量的 99.31%, 其主要成分为醋酸龙脑酯、龙脑、 α -红没药醇、柠檬烯等。结论 HELP 法结合 PTRI 能够提高质谱定性的准确性, 更全面、准确地反映臭冷杉针叶挥发油的化学成分。

关键词: 臭冷杉; 挥发油; GC-MS; 直观推导式演进特征投影法; 程序升温保留指数

中图分类号: R284.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2012)08-1499-04

Analysis on essential oil from needles of *Abies nephrolepis* by GC-MS combining with chemometric resolution method

REN Heng-xin¹, SU Rui², ZHANG Shu-ting¹, ZONG Xi-ming¹, FANG Hong-zhuang¹

1. College of Pharmacy, Jiamusi University, Jiamusi 154007, China

2. First Hospital of Harbin, Harbin 150010, China

Key words: *Abies nephrolepis* (Trautv.) Maxim.; essential oil; GC-MS; heuristic evolving latent projection (HELP); programmed temperature retention index (PTRI)

松科植物臭冷杉 *Abies nephrolepis* (Trautv.) Maxim. 又名臭松、东陵冷杉, 分布于我国东北平原东部山地与华北山地^[1]。臭冷杉挥发油有很强的抗菌、抗炎、降血压、调血脂能力, 对抑制血小板凝聚、防治癌症、增强免疫功能、延缓衰老等均有良好功效, 并可作为食品加香剂、调味剂、防腐剂 and 抗氧化剂^[2-4], 广泛应用于医药、食品、日用化工等行业。臭冷杉挥发油化学组成复杂, 对其成分的气相色谱-质谱 (GC-MS) 分析, 目前大多是通过质谱库对所得质谱数据进行检索, 经分析比较确定成分的归属^[5-7]。但由于质谱库匹配度检索多个物质的排序通常较接近, 相应的顺序时有错误, 再加上色谱中常有重叠色谱峰存在, 使得检索结果会出现偏差, 从而影响定性分析的准确性。

化学计量学中的直观推导式演进特征投影 (heuristic evolving latent projections, HELP) 法可对重叠峰分辨解析^[8], 通过质谱库检索结合程序升温

保留指数 (programmed temperature retention index, PTRI) 能更准确地定性 GC 中的化学成分^[9]。化学计量学多元分辨方法结合保留指数方法已被公认为植物挥发性成分的 GC-MS 数据分析的有效技术手段。为了更准确地揭示臭冷杉挥发油化学成分的组成, 本实验利用 GC-MS 测定臭冷杉针叶挥发油, 采用 HELP 方法与 PTRI 相结合的辅助方法, 对其化学成分进行定性及相对定量分析, 为臭冷杉挥发油质量评价和阐明其化学物质及作用机制提供基础数据。

1 仪器与材料

HP7890A—5975 型气相色谱-质谱联用仪 (美国安捷伦科技有限公司); 标准玻璃挥发油提取器 (上海满贤经贸有限公司)。正己烷 (天津市大茂化学试剂厂, 色谱纯); 无水硫酸钠 (上海绿源精细化工厂, 分析纯); 正构烷烃混合对照品 C₈~C₄₀ (美国 AccuStandard 公司, 编号: DRH-008S-R2)。

臭冷杉新鲜针叶于 2010 年 9 月采于小兴安岭地

收稿日期: 2011-12-30

作者简介: 任恒鑫 (1977—), 男, 黑龙江省佳木斯市人, 硕士研究生, 研究方向为中药分析。Tel: (0454)6557522 E-mail: rhx450@yahoo.cn

*通讯作者 方洪壮 Tel: (0454)8611265 E-mail: fhz-chjms@sohu.com

区, 经佳木斯大学药学院宗希明高级实验师鉴定为臭冷杉 *Abies nephrolepis* (Trautv.) Maxim. 的针叶。

2 方法

2.1 挥发油提取

将臭冷杉针叶阴干后粉碎, 称取样品粉末 100 g, 置于 2 000 mL 圆底烧瓶中, 加蒸馏水 1 000 mL, 按《中国药典》2010 年版一部附录 XD 甲法^[10]提取挥发油 6 h, 得淡黄色挥发油, 记录体积, 加适量无水硫酸钠脱水, 密封、避光冷藏。

2.2 测试条件

2.2.1 色谱条件 色谱柱为 HP-5MS 石英毛细管柱 (30 m×0.25 mm, 0.25 μm), 进样口温度 280 °C, 初始柱温 40 °C, 以 4 °C/min 升至 260 °C, 载气为氦气, 分流比为 100:1, 进样量 1 μL。

2.2.2 质谱条件 标准 EI 源 (70 eV), 离子源温度为 230 °C, 接口温度为 280 °C, 四极杆质量分析器, 扫描范围 30~450 amu。

2.3 溶液制备

2.3.1 供试品溶液制备 取臭冷杉挥发油, 用正己烷转移至 2 mL 量瓶中, 加正己烷溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得。

2.3.2 对照品溶液的制备 精密量取正构烷烃混合对照品 1 mL, 至 5 mL 量瓶中, 加正己烷溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得。

2.4 程序升温线性保留指数的测定

分别取正构烷烃混合对照品溶液和供试品溶液, 按照“2.2”项下测试条件进样测定, 获取色谱数据。提取各组分散色谱峰的保留时间, 根据 van den Dool 等^[11]提出的程序升温线性保留指数计算公式, 计算臭冷杉挥发油各组分的保留指数。

$$I_x = 100n + 100(t_x - t_n / t_{n+1} - t_n)$$

I_x 表示待分析化合物的程序升温保留指数, t_{n+1} 和 t_n 分别代表组分及碳数为 n 和 $n+1$ 正构烷烃的保留时间, t_x 为被测组分保留时间, 且 $t_{n+1} > t_x > t_n$

2.5 重叠峰的解析

采用 HELP 方法对二维数据进行解析, 采用局部因子分析以分辨出单个组分的纯物质的色谱和质谱。实验中所涉及程序采用 Matlab 6.5 软件编写, 在 Pentium IV 2.6GHz 处理器上运行。

臭冷杉挥发油的化学成分较复杂, 从其总离子流图 (图 1) 可以看到, 通过优化色谱条件, 大部分色谱峰基本达到基线分离, 但仍存在少量重叠峰。例如保留时间 23.00~23.20 min 的峰簇 A, 放大色

谱图见图 2, 通过质谱库直接检索发现不同位置呈现出较大的质谱变化, 由左至右其检索结果和相似度分别为葎草烯 (77%)、红没药烯 (32%)、榄香烯 (22%)、金合欢烯 (70%)、依兰烯 (65%), 由于其相似度均低于 90%, 重叠峰无法实现准确定性。但利用 HELP 方法解析后的色谱图 (图 3), 在确定了峰簇的选择性信息和零浓度区后, 解析得到相似度较高的 3 个化合物, 与其相应标准质谱图比较后确定为葎草烯 (96%)、金合欢烯 (97%) 和依兰烯 (95%)。

2.6 质谱库检索结合保留指数的分析

定性分析一直是 GC-MS 数据处理中的一个难点, 通常采用标准物质与质谱数据库相似度匹配的

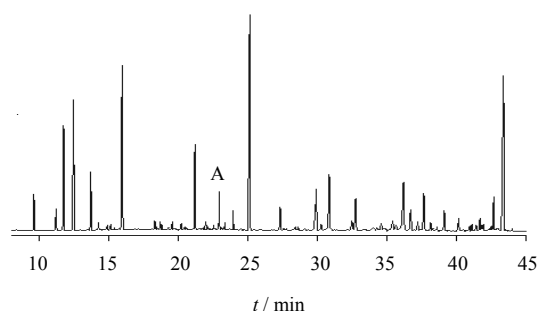


图 1 臭冷杉针叶挥发油的总离子流图

Fig. 1 TIC of essential oil in needles of *A. nephrolepis*

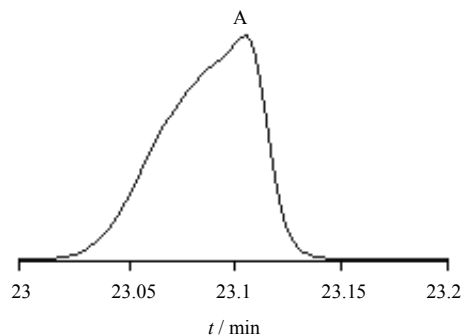
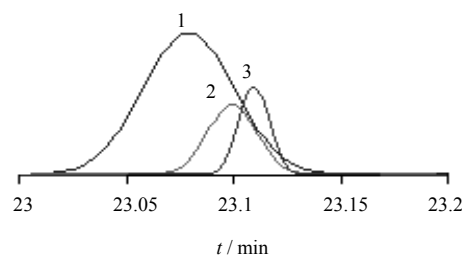


图 2 重叠峰总离子流图

Fig. 2 TIC of overlapped peaks



1-葎草烯 2-金合欢烯 3-依兰烯
1-humulene 2-farnesene 3-murolene

图 3 解析后的色谱图

Fig. 3 Chromatogram after resolution

方法。但由于标准物质质谱数据库中存在很多相似的质谱数据,一个纯色谱峰常得到一组相似度很接近的备选化合物与之对应,难以得到准确的定性结果。尤其对于异构体、同系物等结构特征相似的化合物,由于其质谱图非常相似,单纯依赖于质谱库匹配度检索得到的结果不够准确。在这种情况下,结合化合物的保留指数的信息进行定性就显得十分必要。

对所分辨的质谱在NIST08标准质谱库中检索,根据Van den Dool等提出的程序升温线性保留指数计算公式,以正构烷烃为参比计算臭冷杉挥发油各组分的保留指数。例如保留时间为8.478 min的色谱峰,经质谱库匹配度检索后得到2个相似度较高且很接近的结果,分别为1,3,3-trimethyl-bicyclo [2.2.1] heptan-2-ol acetate 和 fenchyl acetate,相似度分别为93.4%和

92.7%。利用线性程序升温保留指数的计算公式得到保留时间为8.478 min的色谱峰保留指数为1 221,而文献报道 fenchyl acetate 和 1,3,3-trimethyl-bicyclo [2.2.1]heptan-2-ol acetate 的保留指数分别为1 220 和 1 445^[12],故初步确定为 fenchyl acetate,与其相应标准质谱图比较后最终确定其成分(表1)。

2.7 化学成分的定量分析

采用峰面积归一化法对定性后的色谱峰积分,计算臭冷杉针叶挥发油中各组分的相对质量分数。

3 结果

臭冷杉针叶挥发油总离子流图中共72个色谱峰及峰簇,鉴定了其中的63个化合物,占挥发性成分总量的99.31%(表1)。其中8个化合物通过HELP方法解析获得,41个化合物依靠质谱匹配结合保留

表1 臭冷杉针叶挥发油化学成分

Table 1 Components in essential oil from needles of *A. nephrolepis*

峰号	化合物	保留指数	相对质量分数 / %	峰号	化合物	保留指数	相对质量分数 / %
1	檀烯	903	3.458	32	蛇麻烯 [*]	1 456	1.768
2	三环烯	922	0.532	32	金合欢烯 [#]	1 458	0.288
3	α -蒎烯 [#]	933	2.513	32	衣兰油烯 [*]	1 479	0.520
4	茨烯	947	5.018	33	姜黄烯 [*]	1 484	0.303
5	β -蒎烯 [*]	976	1.501	34	β -桉叶烯	1 488	0.319
6	月桂烯 [*]	991	0.173	35	罗汉柏烯 [*]	1 498	0.756
7	3-萜烯 [*]	1 011	0.207	36	紫穗槐烯	1 502	0.643
8	柠檬烯	1 029	3.914	37	红没药烯	1 511	3.881
9	异松油烯 [*]	1 089	0.252	38	α -长叶蒎烯 [*]	1 514	0.237
10	nona-3,5-dien-2-ol [*]	1 090	0.236	39	β -雪松烯	1 518	1.391
11	芳樟醇	1 100	0.414	40	δ -葑烯 [*]	1 526	0.445
12	(1 <i>R</i> ,5- <i>cis</i> ,6- <i>cis</i>)-bicyclo [3.2.2]non-8-en-6-ol [*]	1 103	0.222	41	丁酸香茅酯 [*]	1 529	0.117
13	樟脑烯 [*]	1 127	0.111	42	β -绿叶烯	1 534	2.050
14	水合茨烯 [*]	1 140	0.121	43	α -丁子香烯 [*]	1 545	0.477
15	樟脑 [*]	1 145	0.180	44	香叶丁酸 [#]	1 562	0.147
16	龙脑	1 168	11.78	44	反式橙花叔醇 [#]	1 565	1.909
17	4-松油醇 [*]	1 178	0.128	44	石竹烯氧化物 [#]	1 586	0.503
18	α -松油醇	1 191	0.448	45	(+)-雪松醇	1 604	0.269
19	檀紫三烯 [*]	1 207	0.201	46	溴白檀醇	1 610	0.151
20	乙酸葑酯	1 221	1.682	47	紫丁香烯氧化物 [*]	1 612	0.313
21	3,7-二甲基-2-辛烯-1-醇 [*]	1 229	0.146	48	葑草烯环氧化物	1 631	0.201
22	乙酸芳樟酯	1 257	0.919	49	库贝醇	1 635	0.184
23	乙酸龙脑酯	1 290	30.08	50	坚果醇 [*]	1 640	0.147
24	4-萜烯 [*]	1 347	0.218	51	T-杜松醇	1 658	0.222
25	乙酸松油酯	1 351	1.733	52	绿花白千层醇 [*]	1 661	0.179
26	芳樟醇甲酸 [*]	1 365	0.103	53	雪松烯	1 664	0.164
27	香叶醋酸 [*]	1 384	0.110	54	檀香醇 [*]	1 672	0.301
28	β -广藿香烯	1 404	0.753	55	左旋环烯庚烯醇	1 686	3.413
29	十二醛 [*]	1 409	0.523	56	α -红没药醇 [#]	1 689	6.482
30	槐香烯 [*]	1 412	0.327	56	顺-11-十八碳烯醛 [#]	1 718	0.117
31	丁子香烯 [*]	1 422	2.948	57	香紫苏醇 [*]	2 151	0.355
				58	二十三烷	2 229	0.107

*利用保留指数辅助定性 #利用HELP方法解析重叠峰

*quantitation assisted by retention # quantitation assisted by HELP resolution

指数进行辅助定性。通过对 63 个化合物进行归类分析发现, 相对质量分数最高为烯类 36.82%, 其次为酯类 33.21%、醇类 28.89%、醛类 0.523%、酸类 1.682%、酮类 0.18%。其中相对质量分数在 2% 以上的化合物共有 12 种, 分别为醋酸龙脑酯 (30.08%)、龙脑 (11.78%)、 α -红没药醇 (6.482%)、苾烯 (5.018%)、柠檬烯 (3.914%)、红没药烯 (3.881%)、檀烯 (3.458%)、左旋-环烯庚烯醇 (3.413%)、丁子香烯 (2.948%)、 α -蒎烯 (2.513%)、 β -绿叶烯 (2.05%)、反式-橙花叔醇 (1.909%), 占臭冷杉挥发油总量的 77.45%。

4 讨论

多组分复杂体系的化学成分色谱分离, 是分析化学中的难点。全二维气相色谱-飞行时间质谱 (GC $\times$ GC-TOFMS) 技术, 可使第一维重叠峰在第二维得以分离, 增加了获得纯质谱的可能性^[13-14]。虽然 GC $\times$ GC-TOFMS 可增大峰容量和检测灵敏度, 但也部分存在一维色谱的重叠峰的解析和准确定性的问题, 同时还受到仪器的价格及普及性限制。

化学计量学的数学分离具有较强的重叠峰解析能力, 其中 HELP 法采用三维秩图结合数据的特征投影图确定色谱的纯浓度区和重叠区, 更直观地用逐步推导式的方式从色谱-光谱二维矩阵数据包含的信息中分辨出单个组分的纯色谱和光谱。该方法不仅适于二维色谱的数据处理, 也可用于二维色谱数据的重叠峰分辨。另外保留指数法是色谱定性的有效辅助手段, 因其仅与固定相的性质、柱温有关, 所以具有良好的准确度和重现性。将保留指数与化学计量学多元分辨方法结合运用, 具有良好的应用前景。

本实验采用 HELP 法以及质谱库检索结合保留指数法对臭冷杉挥发油进行定性分析, 从小兴安岭臭冷杉挥发油中鉴定出 63 个组分, 远远多于相关文献报道^[7], 在一定程度上突破了一维气相色谱分离技术条件限制, 与单纯采用相似度匹配来处理数据的方法相比, 显著提高定性定量的科学性和准确度。不同产地的臭冷杉挥发油的组成成分和相对质量分数上均有较大差异。实验结果表明, 小兴安岭地区臭冷杉挥发油中相对质量分数最高组分为醋酸龙脑酯 (30%), 与文献报道^[5-6]的吉林延边地区及长白山地区臭冷杉挥发油中最高量组分柠檬烯 (27%、29%) 明显不同。从挥发油成分的化学结构来看, 小兴安岭地

区臭冷杉挥发油中主要含有烯类、酯类和醇类物质, 而且烯类与其对应醇类化合物, 或者醇与其对应酯类化合物通常同时出现。而文献中的延边地区及长白山地区臭冷杉挥发油中并未出现此现象, 这是否与小兴安岭地区臭冷杉生长环境有关, 有待进一步研究。

参考文献

- [1] 刘增力, 方精云, 朴世龙. 中国冷杉、云杉和落叶松属植物的地理分布 [J]. 地理学报, 2002, 57(5): 577-586.
- [2] 刘威, 周重楚, 师海波, 等. 臭冷杉精油的镇咳祛痰平喘作用 [J]. 中草药, 1990, 21(6): 268-269.
- [3] 师海波, 周重楚. 臭冷杉精油的抗炎作用 [J]. 中草药, 1991, 21(8): 353-356.
- [4] Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, *et al.* Biological effects of essential oils—A review [J]. *Food Chem Toxicol*, 2008, 46(2): 446-475.
- [5] 杨智蕴, 姜子涛, 顾景贤, 等. 臭冷杉针叶挥发油化学成分研究 [J]. 植物学报, 1990, 32(2): 133-136.
- [6] 徐永红, 申仁花, 李东省, 等. 延边地区臭冷杉精油化学成分的研究 [J]. 延边大学学报: 自然科学版, 1994, 20(4): 392-421.
- [7] 薄采颖, 郑光耀, 宋强, 等. 马尾松、樟子松、臭冷杉针叶精油的化学成分比较研究 [J]. 林产化学与工业, 2010, 30(6): 45-50.
- [8] Kvalheim O M, Liang Y Z. Heuristic evolving latent projection resolving two-way multicomponent data. 1. Selectivity, latent projective graph, datascope, local rank analysis and unique resolution [J]. *Anal Chem*, 1992, 64(8): 936-946.
- [9] 赵晨曦, 梁逸曾, 胡黔楠, 等. 气相色谱定性方法研究进展 [J]. 分析化学, 2005, 33(5): 715-721.
- [10] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [11] van den Dool H, Krats P D. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas liquid partition chromatography [J]. *J Chromatogr*, 1963, 11: 463-471.
- [12] Magiatis P, Melliou E, Skaltsounis A L, *et al.* Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Pistacia lentiscus* var. *chia* [J]. *Planta Med*, 1999, 65(1): 749-751.
- [13] Gao X, Yang X, Mitrevski B S, *et al.* Headspace solid-phase microextraction combined with GC $\times$ GC-TOF MS for the analysis of volatile compounds of *Coptis* species rhizomes [J]. *J Sep Sci*, 2011, 34(10): 1157-1166.
- [14] 路鑫. 全二维气相色谱/飞行时间质谱用于复杂体系分析的方法学研究 [D]. 大连: 中国科学院大连化学物理研究所, 2004.