

基于顶空-固相微萃取-气相色谱-三重四极杆质谱联用的诃子挥发性成分分析

谭 鹏¹, 周永峰¹, 黄浩洲¹, 朱 薇², 包晓明², 林俊芝³, 张定堃^{1*}, 赵军宁^{4*}

1. 成都中医药大学药学院, 四川 成都 611137

2. 岛津企业管理(中国)有限公司, 四川 成都 610023

3. 成都中医药大学附属医院中心实验室, 四川 成都 610072

4. 四川省中医药科学院 国家中医药管理局中药质量生物评价重点实验室, 四川 成都 610041

摘要:目的 建立一种基于顶空-固相微萃取-气相色谱-三重四极杆质谱联用技术的诃子药材中挥发性成分快速筛查与定量分析方法, 并用于评价不同产地的诃子质量差异性。方法 采用 InertCap Pure-WAX 毛细管柱(30 m×0.25 mm×0.25 μm)为色谱柱; 进样口温度为 250 ℃, 分流比为 5:1, 高压进样压力为 83.5 kPa; 载气为高纯氦气, 载气控制方式为恒压力模式; 色谱柱流量为 1.43 mL/min, 线速度为 43.3 cm/s, 吹扫流量为 3.0 mL/min; 程序升温: 初始温度为 50 ℃, 保持 5 min, 以 10 ℃/min 升温至 250 ℃, 保持 10 min; 柱平衡时间为 2.0 min。离子源为电子轰击源(EI), 检测器电压 0.3 kV, 离子源温度为 200 ℃, 质谱传输接口温度为 250 ℃, 碰撞气为氩气; 质谱监测模式为多反应监测。结果 分析结果显示, 在诃子药材中共筛查出 86 种挥发性化合物, 按化合物结构可分为酯、酮、醛、烯、酚、酸、醇、苯、醚、吡嗪、酰胺 11 类。测定结果表明, 不同产地的诃子在挥发性成分在种类上没有差异, 但是不同产地的诃子中部分挥发性成分的含量存在较大差异。主成分分析结果显示, 以诃子中 86 种挥发性成分的含量为降维指标分析, 能在一定程度上区分不同产地的诃子, 但区分不明显, 这初步提示不同产地的诃子中挥发性成分的累积具有一定地域特征。结论 建立的诃子中 86 种挥发性成分的快速筛查和定量分析方法, 具有高通量、准确和简便的特点, 对其它中药材的挥发性成分分析具有参考价值。

关键词: 诃子; 顶空-固相微萃取-气相色谱-三重四极杆质谱联用技术; 挥发性成分; 快速筛查与定量分析; 质量评价

中图分类号: R286.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2021)11-3398-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.11.028

Analysis of volatile compounds in *Chebulae Fructus* based on head space-solid phase microextraction-gas chromatography-triple quadrupole mass spectrometry

TAN Peng¹, ZHOU Yong-feng¹, HUANG Hao-zhou¹, ZHU Wei², BAO Xiao-ming², LIN Jun-zhi³, ZHANG Ding-kun¹, ZHAO Jun-ning⁴

1. College of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

2. Shimadzu Enterprise Management (China) Co. Ltd, Chengdu 610023, China

3. Central Laboratory, Teaching Hospital of Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610072, China

4. State Key Laboratory of Quality Evaluation of Traditional Chinese Medicine, Sichuan Academy of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610041, China

Abstract: Objective To establish a method for rapid screening and quantitative analysis of volatile compounds in chebulae fructus by head space-solid phase microextraction-gas chromatography-triple quadrupole mass spectrometry, and this new analytical method was used to evaluate the quality difference of chebulae fructus collected in different pieces. **Methods** An InertCap Pure-WAX column was used as a separation column, and the detailed parameter information was 30 m × 0.25 mm × 0.25 μm. The injection port temperature was 250 ℃. The injection mode was split injection with a ratio of 5:1. The high pressure injection value was set to 83.5 kPa. The carrier gas was high purity helium and control mode was set to constant pressure. The column flow rate was 1.43 mL/min, the

收稿日期: 2020-09-06

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(81973493); 四川省杰出青年科技人才项目(2019JDJQ0007); 四川省中医药标准化研究项目(2019082); 成都市科技创新平台资助项目(2019-YF04-00086-JH)

作者简介: 谭 鹏, 中药学博士, 副研究员, 主要从事中药质量评价新技术研究。E-mail: 410578772@qq.com

***通信作者:** 张定堃, 中药学博士, 副教授, 主要从事中药制剂与品质评价新技术研究。E-mail: 465790643@qq.com

赵军宁, 博士, 研究员, 主要从事广义中药学和中药药理学研究。E-mail: zarmy@189.cn

linear velocity was 43.3 cm/s, and the purge flow rate was 3.0 mL/min. The column temperature program as follows: maintain the initial temperature at 50 °C for 5 min, and increased the temperature at a rate of 10 °C per minute to 250 °C, hold for 10 min. the column equilibration time was 2 min. Mass spectrometry detector was triple-quadrupole mass spectrometer, ionization source was electron ionization, the detector voltage was 0.3 kV, and the ionization source temperature was 200 °C, collision gas was high purity argon; MS transfer line temperature was 250 °C. The monitoring mode was set to multiple reaction monitoring. **Results** The analysis results showed that a total of 86 kinds of volatile compounds were screened out in *Chebulae fructus*, which can be divided into 11 types according to the compound structure, including: esters, ketones, aldehydes, alkenes, phenols, acids, alcohols, benzenes, ethers, pyrazines, amides, etc., and this proved that the “sour gas” emitted by *Chebulae Fructus* was a complex odor composed of at least 86 volatile compounds. The results showed that there was not much difference in the types of volatile compounds in *Chebulae Fructus* in different regions, but there are large differences in the contents of some volatile compounds in *Chebulae Fructus* produced in different regions. The results of principal component analysis showed that the content of 86 volatile compounds in *Chebulae Fructus* as the dimensionality reduction index analysis could prove to a certain extent that there are differences in the quality of *Chebulae Fructus* collected in different pieces, but this evidence was not obvious. This result preliminarily indicated that the accumulation of volatile compounds in *Chebulae Fructus* had regional characteristics. **Conclusion** In summary, this newly developed method for rapid screening and quantitative analysis of 86 kinds of volatile compounds in *Chebulae Fructus* has the characteristics of high throughput, accuracy, and simplicity, and has reference value for volatile compounds analysis of other traditional Chinese medicines.

Key words: *Chebulae Fructus*; HS-SPME/GC-QQQ-MS/MS; volatile compounds; rapid screening and quantitative analysis; quality evaluation

诃子 *Chebulae Fructus* 又叫诃黎勒, 为使君子科植物诃子 *Terminalia chebula* Retz. 或绒毛诃子 *Terminalia chebula* Retz. var. *tomentella* Kurt. 的干燥成熟果实, 味酸、涩, 功能涩肠止泻、敛肺止咳、降火利咽, 临床用于久泻久痢、肺虚喘咳、咽痛音哑等症^[1]。诃子在藏成药中使用广泛, 享有“藏药之王”的美誉^[2]。现代研究表明, 诃子具有抗氧化^[3-5]、抗菌^[6-7]、抗腹泻^[8]、修复肝损伤^[9-10]等多种药理作用, 具有较高的药用开发价值。

诃子药材闻起来有一种“酸”的嗅觉, 但诃子散发出的这种“酸”气中含有哪些化学成分, 其“酸气”强度与其质量差异是否存在关联性等方面尚未见到相关研究报道。客观量化评价中药材的挥发性成分是一个难点, 主要在于缺少一些高通量、准确、快速、实用的分析手段。顶空-固相微萃取 (head space-solid phase micro-extraction, HS-SPME) 是一种样品前处理技术, 集提取、富集、解吸和进样等步骤于一身, 具有操作简便快速, 灵敏度高, 避免使用有机溶剂等特点。HS-SPME 技术适合分析易挥发性和半挥发性物质, 它能全面快速地获得样品中挥发性物质的组成信息^[11-12]。本研究尝试基于顶空-固相微萃取-气相色谱-三重四极杆质谱联用技术 (HS-SPME/GC-QQQ-MS/MS) 建立一种诃子药材挥发性快速分析方法, 辨识诃子“酸气”中的化学成分, 探讨不同产地诃子之间的挥发性成分差异, 以期从诃子挥发性成分分析的角度为诃子的质量差异评价提供客观数据支撑。

1 仪器与材料

1.1 仪器

TQ8050 三重四极杆气质联用仪 (Shimadzu, 日本), 配备 PAL 加热磁力搅拌模块, 数据分析软件配备 Off-flavor-TQ-MS 数据库; PAL SPME Arrow 固相微萃取进样器 (1.5 mm×120 μm×20 mm, PN: ARR15-DVB/C-WR-120/20CT, CTC Analytics AG, Switzerland), PAL SPME Fiber 固相微萃取进样器 (95 μm×10 mm, Carbon WR Fiber, PN: FIB-C-WR-95/10, CTC Analytics AG, Switzerland), XPE26 电子天平 (Mettler Toledo 公司, 瑞典)。

1.2 试药

苯乙酮 (2 μg/mL, 批号 48292, Sigma 公司)、萘 (5 μg/mL, 批号 40053, Sigma 公司)、2,6-二氯苯酚 (2 μg/mL, 批号 40302, Sigma 公司)、2,4,6-三氯苯甲醚 (2 μg/mL, 批号 47526-U, Sigma 公司) 4 种化合物用于评估系统适应性。4-溴氟苯和 1,2-二氯苯-d4 的混合溶液 (2 mg/mL, 批号 47358-U, Sigma-Aldrich 公司), 萘-d10 (2 mg/mL, 批号 48417, Sigma-Aldrich 公司) 3 种化合物用作内标物。

1.3 药材

21 批次诃子药材来自于印度、印度尼西亚、越南、缅甸和中国云南省临沧市等地, 样品均由成都市食品药品检验研究院文永盛主任中药师鉴定为诃子 *Terminalia chebula* Retz.。具体样品信息见表 1。

表1 21个诃子样品的采集信息

Table 1 Details of 21 *Chebulae Fructus* samples

编号	产地	采收年份	采集地点
yp01	印度尼西亚	2018	成都荷花池药材市场
yp02	印度尼西亚	2018	成都荷花池药材市场
yp03	印度	2018	成都荷花池药材市场
yp04	印度	2018	成都荷花池药材市场
yp05	越南	2018	广西玉林中药材市场
yp06	越南	2018	广西玉林中药材市场
yp07	越南	2018	广西玉林中药材市场
yp08	越南	2018	广西玉林中药材市场
yp09	缅甸	2018	成都荷花池药材市场
yp10	缅甸	2018	成都荷花池药材市场
yp11	中国云南	2018	成都荷花池药材市场
yp12	中国云南	2018	成都荷花池药材市场
yp13	中国临沧永德	2018	云南临沧市永德县
yp14	中国临沧永德	2018	云南临沧市永德县
yp15	中国临沧永德	2018	云南临沧市永德县
yp16	中国临沧永德	2018	云南临沧市永德县
yp17	中国临沧永德	2018	云南临沧市永德县
yp18	中国临沧永德	2018	云南临沧市永德县
yp19	中国临沧永康	2018	云南临沧市永康镇
yp20	中国临沧永康	2018	云南临沧市永康镇
yp21	中国临沧永康	2017	云南临沧市永康镇

2 方法与结果

2.1 气相色谱条件

色谱柱为 InertCap Pure-WAX 毛细管柱 (30 m×0.25 mm×0.25 μm); 进样口温度为 250 ℃, 分流进样, 分流比为 5:1, 进样口压力为 83.5 kPa; 载气为高纯氦气, 载气控制方式为恒压力模式; 吹扫流量为 3.0 mL/min; 程序升温: 初始温度为 50 ℃, 保持 5 min, 以 10 ℃/min 升温至 250 ℃, 保持 10 min; 柱平衡时间为 2.0 min。

2.2 质谱条件

离子源为电子轰击源 (EI), 离子化能量 70 eV, 离子源温度为 200 ℃, 质谱传输接口温度为 250 ℃, 碰撞气为氦气; 质谱监测模式为多反应监测 (multiple reaction monitoring, MRM), 检测器电压相对于调谐结果 +0.3 kV, 溶剂延迟时间为 1.3 min。各化合物的监测离子对、碰撞电压 (CE) 见表 2。为提高检测灵敏度, 本实验采用时间分段监测各化合物。

2.3 顶空-固相微萃取条件

诃子样品碎粉成细粉 (过三号筛), 准确称取 0.5 g, 置于 20 mL 惰性顶空瓶内, 50 ℃平衡 40 min。进样前后, 固相萃取头在 270 ℃老化装置中自动老化 3 min, 通过聚四氟乙烯隔垫插入顶空瓶内, 不接触样品, 在 50 ℃恒温下萃取吸附 10 min 后, 抽出萃取头, 迅

表2 153个化合物 (包含3个内标物) 的监测离子对、碰撞电压参数

Table 2 Monitoring ion pairs and collision voltage parameters of 153 compounds

编号	化合物	定量离子对 (m/z)	碰撞能量/eV	定性离子对 (m/z)	碰撞能量/eV	比率/%	定性离子对 (m/z)	碰撞能量/eV	比率/%
1	丙酸	74>56	6	74>46	18	52.34	57>29	9	72.40
2	正戊醛	86>58	3	67>65	9	37.42	71>53	15	4.46
3	3-羟基-2-丁酮	45>43	18	88>45	6	81.53	45>27	18	98.63
4	甲基丙烯酸甲酯	69>41	6	100>69	9	21.06	69>39	21	44.98
5	二甲基二硫	94>79	12	94>61	9	33.58	79>64	15	36.32
6	异丁酸	73>55	12	88>73	6	48.53	73>27	27	29.23
7	乙酸仲丁酯	87>43	3	56>41	9	88.79	56>39	21	29.32
8	正戊醇	70>55	6	55>53	9	4.29	70>53	15	1.71
9	甲苯	91>65	18	91>39	27	52.70	65>39	18	13.47
10	5-己烯-2-酮	98>43	6	83>55	6	80.14	98>83	9	30.65
11	正丁酸	60>42	9	73>55	9	48.32	60>45	15	17.53
12	2-己酮	100>85	3	100>71	6	57.86	85>57	6	50.33
13	4-甲基-3-戊烯-2-酮	98>83	6	83>55	6	97.54	98>55	18	33.35
14	正己醛	56>41	9	82>67	6	25.66	56>39	18	31.46
15	乙酸丁酯	73>43	6	61>43	12	52.86	73>55	6	9.45
16	2-甲基吡嗪	94>67	12	67>40	6	32.62	94>40	18	20.81
17	异戊酸	60>42	12	87>69	9	25.90	60>45	15	17.80
18	2-甲基丁酸乙酯	102>74	9	115>87	6	16.78	102>56	12	12.55
19	2-甲基丁酸	74>56	9	87>69	9	48.12	87>59	9	32.26
20	乙苯	106>91	12	91>65	18	99.46	106>65	27	17.72
21	丙二醇甲醚乙酸酯	87>43	3	72>57	6	81.33	72>29	18	55.58
22	间二甲苯	106>91	18	91>65	18	94.35	91>39	27	43.48
23	对二甲苯	106>91	15	91>65	18	82.99	91>39	27	44.30

续表 2

编号	化合物	定量离子对 (m/z)	碰撞能量/eV	定性离子对 (m/z)	碰撞能量/eV	比率/%	定性离子对 (m/z)	碰撞能量/eV	比率/%
24	正戊酸	60>42	18	73>55	9	59.43	60>45	18	20.70
25	3-庚酮	85>57	6	85>41	12	28.39	114>85	6	13.30
26	2-庚酮	71>43	9	114>85	6	31.99	71>41	18	29.78
27	苯乙烯	104>78	12	78>52	18	29.93	104>52	27	19.76
28	邻二甲苯	106>91	18	91>65	18	90.17	106>65	27	17.57
29	乙二醇单丁醚	87>57	6	100>72	3	12.88	87>45	9	48.54
30	乙二醇乙醚醋酸酯	72>44	6	88>61	6	16.39	72>42	15	24.97
31	2-乙基吡嗪	107>79	15	107>52	24	68.15	80>53	9	38.94
32	2,3-二甲基吡嗪	108>67	12	108>81	6	5.78	108>93	12	2.25
33	二乙基二硫醚	122>94	9	94>66	6	51.83	122>66	18	30.07
34	α -蒎烯	93>77	12	93>51	27	39.91	136>93	12	11.95
35	β -蒎烯	93>91	6	93>77	12	89.00	93>51	24	25.29
36	异己酸	83>55	6	74>56	6	71.21	101>55	12	10.48
37	(E)-2-庚烯醛	83>55	9	83>53	15	25.06	112>83	6	4.50
38	5-甲基呋喃醛	110>53	27	81>53	6	30.01	110>81	6	29.85
39	苯甲醛	105>77	15	106>77	21	79.95	77>51	15	75.61
40	二甲基三硫	126>79	15	126>61	9	35.37	79>64	15	28.12
41	正己酸	73>55	9	87>45	9	14.53	73>27	18	32.11
42	苯酚	94>66	9	66>40	12	43.83	94>40	24	41.35
43	2-苯基-1-丙烯	103>77	12	118>1	18	45.69	103>51	27	39.89
44	2-辛酮	128>85	6	128>57	18	45.15	128>72	3	37.81
45	2-氯苯酚	128>64	18	128>92	9	26.18	100>65	9	17.59
46	2-丙基吡啶	93>66	12	106>78	18	72.31	93>78	18	47.55
47	正辛醛	84>55	12	100>82	3	29.73	84>69	6	59.11
48	乙酸己酯	69>41	9	84>55	12	60.99	84>69	3	47.74
49	(E,E)-2,4-庚二烯醛	110>81	6	81>53	12	98.88	81>27	18	43.91
50	对二氯苯	146>111	18	146>75	27	59.06	111>75	18	54.96
51	5-乙基-2-甲基-吡啶	106>77	15	121>106	12	92.04	106>79	9	59.51
52	2-乙基己醇	83>55	9	98>56	6	17.52	83>41	18	23.05
53	双戊烯	136>93	15	107>91	12	104.64	107>65	24	43.46
54	桉叶油醇	139>43	18	154>139	3	31.03	154>125	6	35.70
55	苯甲醇	108>79	18	79>51	24	65.73	108>77	27	60.11
56	苯乙醛	91>65	18	120>91	18	56.44	91>39	27	46.00
57	2-羟基苯甲醛	122>65	24	122>93	18	69.18	104>76	12	38.22
58	邻甲酚	108>77	27	108>79	18	98.90	90>63	27	22.46
59	苯乙酮	105>77	15	120>105	6	66.09	105>51	24	33.29
60	正辛醇	69>41	9	84>55	9	51.26	84>69	6	36.88
61	2-溴苯酚	172>65	18	174>65	18	96.63	172>93	9	33.12
62	5-壬酮	85>57	6	142>100	6	7.69	85>41	12	26.32
63	正庚酸	87>59	9	101>55	12	31.55	87>45	12	77.56
64	4-甲基苯酚	107>77	18	77>51	18	35.41	107>51	27	33.40
65	间甲酚	108>77	27	108>79	18	103.90	108>90	15	49.05
66	2-氯-6-甲基苯酚	107>77	18	142>107	15	62.93	107>79	9	42.30
67	苣荬醇	124>91	6	91>65	12	85.47	91>39	27	48.66
68	邻甲氧基苯酚	124>109	12	109>81	12	137.16	124>81	24	61.86
69	3-乙基-4-甲基吡啶	106>77	15	121>106	12	87.08	106>79	9	81.13
70	2-异丙基-3-甲氧基吡嗪	152>137	9	137>109	9	74.24	152>124	6	42.88
71	2-壬酮	71>43	9	142>99	6	23.82	71>41	12	44.62
72	山梨酸乙酯	95>67	9	140>97	12	26.80	95>65	12	45.91
73	芳樟醇	93>77	15	121>93	9	15.23	93>51	27	36.53
74	2-壬醇	69>41	9	98>56	9	20.47	69>39	24	29.77
75	苯乙醇	91>65	15	122>92	6	71.67	91>63	24	33.65
76	均四甲苯	119>91	15	134>119	27	32.92	119>77	24	57.65
77	异佛尔酮	82>54	9	138>82	9	46.60	82>39	18	82.11
78	马鞭烯醇	119>91	12	119>117	9	65.43	119>77	21	39.05
79	2-蒎酮	95>55	18	152>108	6	70.80	95>67	12	93.95
80	(E)-壬烯醛	83>55	6	96>81	6	44.56	83>29	15	32.85
81	对乙基苯酚	107>77	15	122>107	12	78.92	107>51	27	29.70
82	正辛酸	101>55	12	115>45	12	33.33	101>45	12	70.41
83	2,4-二氯苯酚	162>98	15	162>126	9	29.81	126>98	6	37.71
84	2,3-二甲基苯酚	122>107	15	107>77	18	102.26	107>79	9	34.45
85	2-甲氧基-3-异丁基吡嗪	124>94	12	124>81	9	41.34	124>79	21	22.11
86	2-次醇	95>67	12	139>95	6	20.12	95>55	15	95.08
87	2-异丙基-5-甲基环己醇	95>67	12	138>95	9	46.43	95>55	18	80.82
88	2-溴-4-甲基苯酚	186>107	18	188>107	18	100.10	186>77	30	31.33
89	萘	128>102	21	128>78	21	79.46	102>76	15	13.64

续表 2

编号	化合物	定量离子对 (m/z)	碰撞能量/eV	定性离子对 (m/z)	碰撞能量/eV	比率/%	定量离子对 (m/z)	碰撞能量/eV	比率/%
90	2-甲基异冰片	95>55	21	95>67	15	101.22	95>41	21	31.52
91	水杨酸甲酯	120>92	12	152>120	9	57.03	120>64	21	50.07
92	α -松油醇	136>121	9	121>93	6	58.91	136>93	12	76.70
93	对二溴苯	236>155	21	236>157	21	67.47	155>76	18	73.20
94	癸醛	112>70	6	112>55	15	96.49	112>83	6	87.59
95	2,6-二氯苯酚	162>63	21	162>98	15	72.12	164>63	21	63.33
96	3-烯-2-酮	107>91	12	150>107	12	28.04	107>65	21	38.06
97	(E,E)-2,4-壬二烯醛	81>53	18	138>81	6	42.24	81>27	24	69.88
98	乙二醇苯醚	94>66	12	138>94	9	72.90	94>55	18	15.70
99	苯并噻唑	135>108	18	108>69	21	34.35	135>91	18	32.62
100	苯乙酸	136>91	12	91>65	18	107.71	91>63	27	22.87
101	4-苯基-2-丁酮	148>105	12	148>133	9	58.88	105>77	18	111.62
102	香叶醇	69>41	9	69>39	21	24.27	123>>81	9	4.98
103	丙位辛内酯	85>57	6	100>72	6	4.81	100>58	9	3.64
104	4-丙基苯酚	107>77	18	136>107	9	56.60	107>51	30	24.56
105	1,6-己内酰胺	113>85	6	85>67	6	19.41	113>56	9	46.69
106	壬酸	129>87	9	115>69	9	47.87	115>45	12	54.11
107	反式-2-癸烯醛	107>79	9	107>91	12	49.91	121>93	9	42.84
108	4,6-二氯甲酚	141>77	15	176>141	15	62.69	176>77	30	28.26
109	4-乙基-2-甲氧基苯酚	152>137	15	137>122	12	91.82	137>94	21	91.30
110	2,4-二氯苯甲醚	161>133	12	176>161	12	69.96	176>133	27	57.46
111	甲基壬基甲酮	71>43	9	170>85	15	11.61	71>41	18	39.02
112	吡啶	117>90	18	90>63	24	23.83	117>64	27	11.13
113	2-甲基萘	142>115	30	115>89	18	28.36	115>63	27	22.83
114	(E,E)-2,4-癸二烯醛	81>53	15	152>81	6	21.59	81>79	6	118.36
115	1-甲基萘	142>115	30	115>89	18	28.12	115>65	21	19.05
116	2,4,6-三氯苯甲醚	195>167	15	210>195	15	65.39	210>167	21	39.81
117	丁香酚	164>149	12	164>131	15	53.48	149>121	9	38.91
118	正癸酸	129>87	6	143>87	6	19.87	129>59	18	25.79
119	2,4-二溴苯酚	252>63	27	250>63	27	52.46	250>143	21	58.00
120	2,4,6-三氯苯酚	132>97	12	196>97	27	74.80	196>132	18	57.83
121	1-十一醇	83>55	9	111>69	6	22.40	83>41	18	24.97
122	4,5-环氧-(E)-2-癸烯醛	81>53	18	152>81	6	18.28	81>79	6	157.16
123	2,6-二溴苯酚	252>63	27	250>143	21	89.00	252>143	21	127.54
124	3-甲基吡啶	130>77	27	130>103	18	46.95	103>77	9	18.24
125	甲基丁香酚	178>107	18	178>163	9	90.14	147>91	15	44.67
126	香草醛	152>123	18	123>108	9	23.59	152>109	15	39.63
127	十二醛	110>67	9	140>70	9	34.81	110>81	9	79.70
128	2,4,6-三氯苯胺	195>124	21	195>159	12	74.86	159>124	9	31.60
129	4-溴-2,6-二甲基苯酚	200>121	15	202>121	12	85.66	202>77	30	44.08
130	α -紫罗兰酮	121>77	18	192>177	6	18.45	121>91	12	55.75
131	二甲苯烷醇	112>97	12	112>83	12	46.53	112>69	21	24.35
132	3-苯基丙烯酸	147>91	21	103>77	15	79.53	147>103	15	77.03
133	邻氧萘酮	146>118	12	118>90	12	80.75	146>90	24	46.03
134	异丁香酚	164>149	12	164>131	15	54.96	149>121	9	43.04
135	丙位癸内酯	85>57	9	128>95	6	17.87	128>71	9	12.38
136	十二醇	111>69	6	111>55	12	25.52	125>69	9	22.46
137	β -紫罗酮	177>162	15	177>147	24	102.73	192>177	9	20.93
138	2,6-二溴-4-甲基苯酚	266>185	18	264>185	21	67.44	266>187	18	65.12
139	2,6-二叔丁基对甲酚	220>205	12	205>177	9	72.80	205>145	15	59.30
140	双(2-甲基-3-呋喃基)二硫醚	226>113	12	113>85	6	42.16	113>45	18	53.35
141	正十二酸	157>87	9	200>87	9	13.29	157>59	21	23.00
142	2,4,6-三溴苯甲醚	344>329	12	344>301	24	43.60	301>141	30	14.10
143	二苯甲酮	105>77	12	182>105	15	29.68	105>51	27	35.26
144	2,4,6-三溴苯酚	332>143	30	330>141	27	114.28	332>222	27	130.63
145	1-十四醇	111>69	9	111>41	24	38.01	168>55	24	5.02
146	丙位十二内酯	85>57	6	128>95	6	16.77	85>29	12	136.20
147	二苄基二硫醚	91>65	18	246>91	12	23.99	181>166	18	14.89
148	乙酸乙酯	70>55	6	88>61	6	14.32	70>43	18	14.77
149	2,3-丁二酮	86>43	3	43>15	15	47.92	43>14	30	29.29
150	乙酸	60>43	6	60>42	6	63.66	60>45	6	61.60
151	4-溴氟苯*	174>95	15	95>75	15	137.77	174>75	27	39.43
152	1,2-二氯苯-d4*	150>115	15	150>78	27	56.89	115>78	12	49.62
153	苊-d10*	164>162	15	162>160	21	86.30	162>134	27	8.47

*代表内标物质

* Represents internal standard substance

速插入在预运行状态下的 GC-MS 进样口,于 250 °C 状态下解吸 2 min 后,进行 GC-MS/MS 分析。

2.4 供试品定性定量方法

先精密吸取苯乙酮、萘、2,6-二氯苯酚和 2,4,6-三氯苯甲醚等 4 种化合物的混合对照溶液 1 μL(在 10 mL 量瓶中加入甲醇 5 mL,用移液器精密吸取 4 种化合物的对照品溶液各 10 μL 加入量瓶中,用甲醇定容至刻度,摇匀,经 0.22 μm 微孔滤膜过滤,即得)进样分析,评估仪器系统的适用性。再精密吸取 4-溴氟苯、1,2-二氯苯-d4、萘-d10 等 3 种内标物的混合溶液 1 μL(在 10 mL 量瓶中加入甲醇 5 mL,用移液器精密吸取 4-溴氟苯和 1,2-二氯苯-d4 的混合对照品溶液、萘-d10 对照品溶液各 10 μL 加入量瓶中,用甲醇定容至刻度,摇匀,用移液器精密吸取此混合溶液 50 μL 加入 1 mL 量瓶中,用甲醇定容至刻度,摇匀,过 0.22 μm 微孔滤膜,即得)进样分析,获得内标物的峰面积。最后再按照上述条件测定样品。目标化合物的定性是根据定性定量离子对确认,目标化合物的定量

是根据岛津 TQ8050 再解析软件内 150 种化合物的标准曲线结合内标物的实测峰面积来定量。

2.5 诃子挥发性成分定性分析

定性分析结果显示,从诃子药材中共筛查出 86 种挥发性化合物,按化合物结构可分为 11 类,包括酯类、酮类、醛类、烯类、酚类、酸类、醇类、苯类、醚类、吡嗪类、酰胺类等。典型的诃子 18 号供试品 MRM 监测总离子流图(TIC)见图 1,结果见表 3。

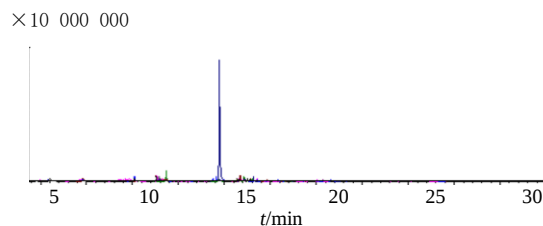


图 1 典型的诃子 18 号供试品 MRM 监测 TIC 图

Fig. 1 Typical total ion chromatogram of *Chebulae Fructus* sample yp18

表 3 9 个代表性诃子样品中挥发性成分筛查与定量分析结果

Table 3 Results of odor screening and quantitative analysis of nine *Chebulae Fructus* samples

类型	成分	质量分数/(ng·g ⁻¹)								
		yp01	yp03	yp06	yp09	yp11	yp13	yp15	yp17	yp23
酯类	醋酸乙酯	—*	0.79	0.68	—	0.37	0.90	1.13	1.51	—
	乙酸丁酯	0.13	—	—	—	—	—	—	—	—
	丙二醇甲醚醋酸酯	0.02	0.01	0.03	0.03	0.02	0.02	0.03	0.03	0.05
	乙酸己酯	0.00	0.01	—	—	0.00	—	—	—	—
	水杨酸甲酯	0.18	0.07	0.25	0.35	0.14	0.17	0.14	0.14	0.36
	丙位癸内酯	0.02	—	0.01	0.02	0.01	0.00	0.00	0.00	0.01
酮类	2,3-丁二酮	—	1.16	—	3.67	2.30	—	—	—	2.64
	4-甲基-3 戊烯-2-酮	0.09	0.02	—	0.03	0.02	0.07	0.10	0.08	0.07
	2-庚酮	0.07	—	0.04	0.02	0.02	0.06	0.10	0.11	0.19
	仲辛酮	0.11	0.02	0.04	0.11	0.04	0.07	0.09	0.11	0.33
	2-壬酮	0.80	—	0.13	—	0.06	0.51	0.54	0.92	2.04
	2-癸酮	1.53	0.21	1.48	0.28	0.15	0.64	0.60	0.60	0.71
	异佛尔酮	—	0.01	0.03	0.03	0.02	0.02	0.03	0.02	0.04
	苯乙酮	0.01	0.11	0.13	0.45	0.00	0.18	0.19	0.17	0.16
	α-紫罗酮	0.03	0.01	0.03	0.02	0.01	0.12	0.12	0.18	0.04
	β-紫罗酮	0.01	0.01	0.02	0.01	0.01	0.04	0.05	0.06	0.01
醛类	正己醛	—	3.52	4.10	—	—	—	—	—	—
	正辛醛	6.19	2.05	3.60	3.52	3.27	7.67	7.90	10.00	6.60
	(E)-2-庚烯醛	3.16	2.07	3.14	2.11	3.19	—	—	6.94	2.98
	(E,E)-2,4-庚二烯醛	0.03	0.04	0.25	0.03	0.06	0.42	0.01	0.70	0.02
	癸醛	0.67	0.54	0.64	0.45	0.48	0.92	0.93	1.05	0.62
	苯甲醛	3.82	0.23	2.64	8.72	3.02	2.46	2.48	2.26	1.85
	反式-2-壬醛	0.60	0.34	0.36	0.35	0.54	0.59	0.86	0.82	0.55
	5-甲基呋喃醛	17.05	1.53	17.37	16.08	10.09	9.28	9.43	9.52	26.75
	苯乙醛	9.98	0.34	4.11	—	2.39	1.89	1.75	1.95	1.13
	2-羟基苯甲醛	0.04	0.01	0.03	0.05	0.04	0.09	0.09	0.09	0.06
	(E,E)-2,4-壬二烯醛	0.09	0.04	0.05	0.03	0.04	0.11	0.11	0.10	0.05
	十二醛	—	0.27	0.42	—	—	0.20	0.17	0.24	—
	香草醛	0.07	0.02	0.06	0.09	0.10	0.05	0.06	0.05	0.15
	烯类	2-蒎烯	0.10	0.00	0.03	0.05	0.07	0.31	0.29	0.00
β-蒎烯		0.11	0.00	0.01	0.02	0.01	0.16	0.14	0.00	0.02
柠檬烯		0.29	0.61	3.04	0.29	0.38	10.67	10.79	12.95	0.16
苯乙烯		0.12	0.50	0.29	—	0.11	0.13	0.15	0.11	0.08

续表 3

类型	成分	质量分数/(ng·g ⁻¹)								
		yp01	yp03	yp06	yp09	yp11	yp13	yp15	yp17	yp23
酚类	愈创木酚	0.29	0.01	0.03	0.81	0.08	0.01	0.02	0.02	0.06
	邻甲酚	0.37	0.02	0.02	0.03	0.03	—	0.02	0.02	0.02
	苯酚	3.61	0.04	0.07	0.53	0.47	-0.01	-0.01	-0.01	0.14
	甲基丁香酚	—	0.02	0.00	0.04	0.03	—	0.01	0.01	—
	4-乙基-2-甲氧基苯酚	0.07	0.02	0.01	0.01	0.02	0.01	0.01	0.01	0.01
	4-甲基苯酚	0.05	0.01	0.03	—	0.01	0.03	0.04	0.05	0.06
	间甲基苯酚	0.35	0.01	0.04	0.04	0.04	0.04	0.05	0.06	0.05
	丁香酚	0.05	0.04	0.03	0.23	0.11	0.19	0.18	0.15	0.04
	4-乙基苯酚	0.11	0.01	0.03	0.02	0.02	0.01	0.01	0.01	0.01
	4-丙基苯酚	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.02
	2,6-二叔丁基对甲酚	0.00	0.00	0.03	0.00	0.00	0.01	0.01	0.02	0.01
酸类	乙酸	101.29	23.39	101.72	63.72	53.35	85.37	82.86	82.93	115.79
	丙酸	—	—	—	—	—	—	—	—	9.18
	异丁酸	2.88	1.24	2.08	2.96	2.53	1.35	1.32	1.56	2.44
	丁酸	4.98	1.80	4.46	1.43	1.36	4.54	4.09	3.64	2.41
	异戊酸	—	1.40	—	8.51	5.63	1.97	1.86	—	8.80
	正戊酸	1.90	1.30	1.52	1.00	1.28	1.84	1.78	2.02	3.62
	己酸	3.00	1.05	2.88	1.41	1.54	3.25	2.72	3.23	7.00
	庚酸	1.02	0.56	0.74	0.71	0.72	0.70	0.59	0.75	2.12
	辛酸	2.34	0.98	1.39	1.64	1.11	1.28	1.01	1.53	2.74
	壬酸	1.75	0.21	1.01	0.39	0.51	1.18	0.90	2.06	1.99
	正癸酸	1.30	0.46	0.53	0.89	0.42	0.50	0.57	0.52	0.53
	月桂酸	0.33	0.14	0.25	—	—	—	0.47	—	—
醇类	苯乙酸	0.86	—	0.74	0.66	0.65	0.67	0.66	0.67	0.67
	桉叶油醇	0.11	0.58	—	—	0.03	—	—	—	—
	2-乙基己醇	0.17	0.24	0.18	0.17	0.22	0.17	0.18	0.22	0.68
	芳樟醇	—	0.18	0.11	0.06	0.20	1.07	1.14	1.04	—
	正辛醇	2.03	0.62	0.51	0.54	0.31	0.07	0.08	0.12	2.05
	马鞭烯醇	0.16	0.52	0.17	0.08	0.07	0.35	0.39	0.45	0.04
	α-松油醇	0.16	—	0.57	0.08	0.10	0.61	0.65	0.70	0.05
	2-茨醇	0.01	0.17	0.04	0.09	0.06	0.04	0.05	0.05	0.05
	马鞭草烯醇	0.03	0.10	—	—	—	0.13	0.13	—	0.01
	香叶醇	—	0.06	0.07	0.04	0.05	—	—	0.10	0.05
	十一醇	0.03	0.03	0.02	—	0.02	—	—	—	—
	苯甲醇	1.31	0.16	1.51	4.63	2.57	0.87	1.03	0.71	0.54
苯类	苯乙醇	3.09	0.07	1.68	9.91	2.05	0.22	0.33	0.65	0.11
	2-甲基异冰片	0.10	0.22	0.08	0.04	0.04	0.10	0.07	0.07	0.06
	薄荷脑	—	0.44	0.65	0.29	0.20	0.51	0.46	0.59	0.62
	甲苯	0.02	0.07	0.22	0.01	0.01	0.08	0.08	0.09	0.00
	乙基苯	0.02	—	0.02	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.04
	对二甲苯	0.03	—	0.03	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.06
	间二甲苯	0.03	0.12	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.07
	邻二甲苯	0.06	0.08	0.07	0.08	—	0.06	0.07	0.07	0.13
	1,2,4,5-四甲苯	0.02	0.01	0.02	0.01	—	—	0.02	0.01	0.01
醚类	二甲基二硫醚	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	二甲基三硫醚	0.02	0.00	—	—	0.01	—	—	—	—
	乙二醇单丁醚	—	0.02	—	—	0.07	0.03	0.04	—	0.03
吡嗪类	乙二醇苯醚	0.03	0.01	0.01	0.03	0.01	0.01	0.01	0.01	0.07
	2-甲基吡嗪	0.07	0.07	0.02	0.05	0.04	0.03	0.02	—	0.15
	2-乙基吡嗪	0.02	0.00	0.01	0.01	0.00	0.00	0.00	—	0.03
	2-异丙基-3-甲氧基吡嗪	0.01	0.00	—	—	—	0.01	0.01	0.01	—
	2-甲氧基-3-异丁基吡嗪	—	—	—	—	—	0.01	0.02	0.01	—
酰胺类	己内酰胺	0.73	0.30	0.30	0.57	0.30	0.29	0.27	0.23	0.26

—代表未检出

—this means not detected

2.6 诃子挥发性成分定量分析

利用内标法对诃子中筛查出的 86 种挥发性化学成分进行定量分析, 需要指出的是, 由于缺少标准物质, 本实验采用的是数据库里的标准曲线结合

实测内标物质的峰面积进行定量分析, 因此实验中对 86 种化学成分的定量只是“半定量”。由于版面篇幅限制, 表 3 中列出了不同产地代表性诃子样品的定量测定结果。

2.7 不同产地的诃子挥发性成分主成分分析 (principal component analysis, PCA)

鉴于测定的样本量和挥发性成分较多, 数据量较大, 为了探讨能否通过挥发性成分来区分不同产地诃子, 采用 SIMCA-P 14.1 软件对不同产地诃子的 86 种化学成分测定结果进行 PCA。同时考虑到不同产地的诃子外观性状差异较大, 以诃子的外观性状作为分组原则, 以黄棕色且有棱的越南和中国云南临沧永德产诃子作为一组, 以黑色且有深皱纹的缅甸和中国临沧永康产诃子为一组, 以暗棕色且无皱

纹的印度尼西亚和印度产诃子为 1 组, 将各组样品的 86 种挥发性物质的含量测定结果导入软件分析。样本间的得分图显示, 不同产地之间的诃子有一定的区分, 但区分不明显, 见图 2。以越南和中国云南临沧产诃子为例, 两者在外观性状上差异较小 (仅有金黄色颜色深浅差异), 2 个产区的诃子在 PCA 分析过程中组间区分度较小, 但与其它产区的诃子组间区分度较大。组间区分结果能够与产地分组基本吻合, 这提示不同产地的诃子中挥发性成分可能存在地域特征差异, 但仍需大样本量进一步验证。

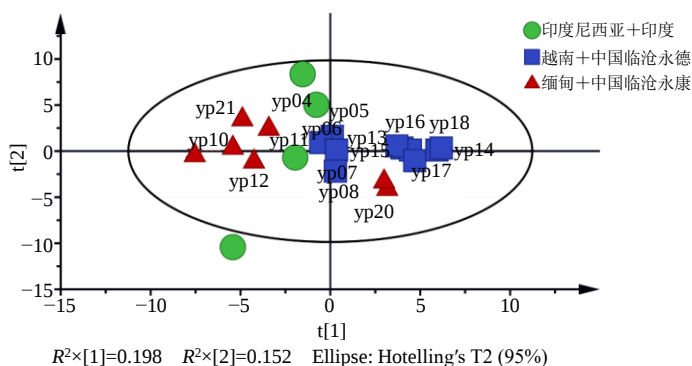


图 2 不同产地的诃子样品中 86 种挥发性化学成分含量 PCA 分析图

Fig. 2 Results of PCA of 86 volatile compounds in *Chebulae Fructus* samples from different regions

载荷散点图 (图 3) 显示了不同挥发性化学成分对产地区分的贡献度大小, 其中贡献度较大的化学成分或许可作为辨识不同产地诃子的特征性化合物。以贡献度最大的化学成分 α -松油醇 (63 号) 为例, 其在 21 个样本中的质量分数平均值为 0.40 pg/g, 但在不同产地分组中的平均质量分数差异较大, 分别为 0.11 (印度尼西亚+印度)、0.62 pg/g (越南+中国临沧永德)、0.25 pg/g (缅甸+中国临沧永康); 箱式图显示了 α -

松油醇在各组含量分布的离散情况, 表明其在缅甸、中国临沧永康产的诃子样本中含量分布差异较大, 是影响产区识别的主要成分。实验中发现乙酸的含量明显高于其余 85 个挥发性成分的含量, 其在 21 个样本中的含量平均值为 89.79 pg/g, 但其对产区识别的贡献度并不大, 箱式图显示其在样本间的含量分布差异大小为缅甸+中国临沧永康 > 印度尼西亚+印度 > 越南+中国临沧永德, 见图 4。

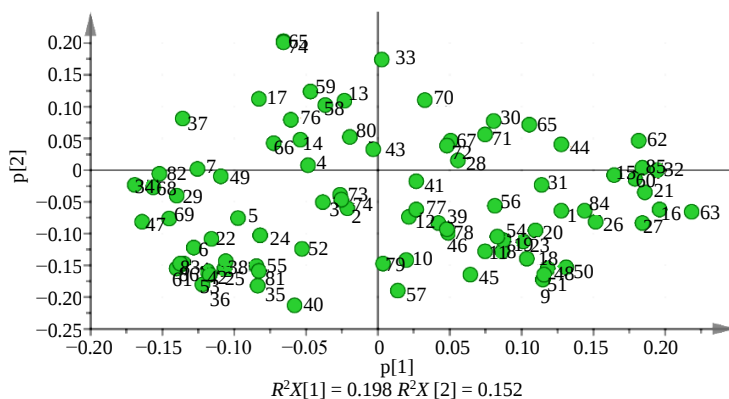
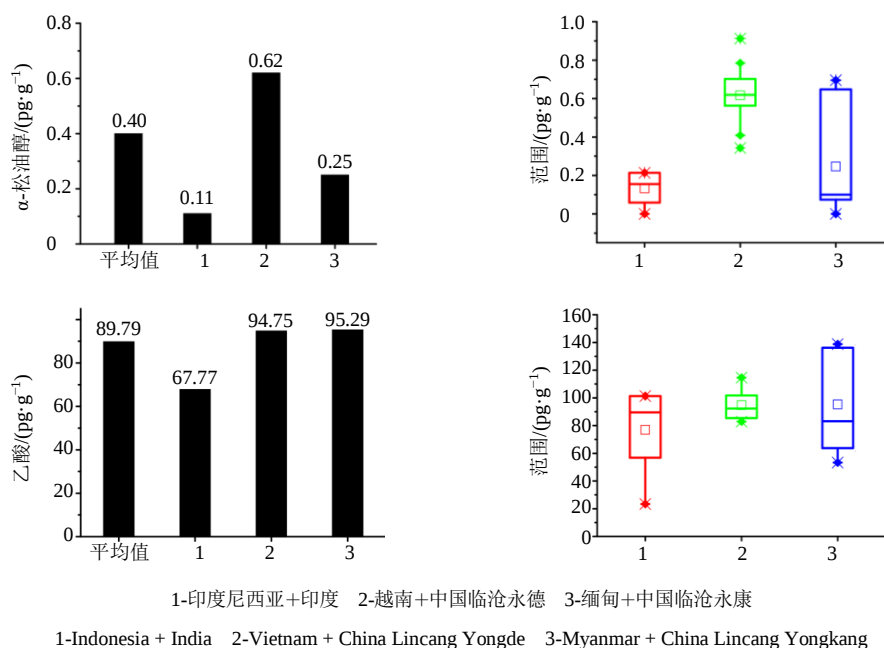


图 3 不同产地的诃子样品中 86 种挥发性化学成分含量 PCA 载荷散点图

Fig. 3 Loading scatter plot of PCA analysis of 86 volatile chemical compounds in *Chebulae Fructus* samples from different regions

图4 不同产地的诃子样品中 α -松油醇和乙酸含量分布情况Fig. 4 Content distribution of α -terpineol and acetic acid in *Chebulae Fructus* samples from different regions

3 讨论

实验中比较了 SPME Arrow 和 SPME Fiber 2 种固相微萃取进样器对诃子中挥发性成分的萃取效率和检测灵敏度。和 SPME Fibe 相比, SPME Arrow 样品萃取时间显著缩短, 减少了转移过程中分析物的损失, 使得检测灵敏度高于 SPME Fiber, 因此最终优选 SPME Arrow 作为本实验的固相微萃取进样器。诃子的化学成分主要有鞣质类^[13-15]、三萜类^[16-17]、黄酮类^[18]等。有文献报道诃子药材中含有挥发性成分^[19-20], 本研究进一步明确诃子药材中至少有 86 种挥发性成分, 按化合物结构可分为酯、酮、醛、烯、酚、酸、醇、苯、醚、吡嗪、酰胺 11 类, 且主要为脂溶性成分, 丰富了诃子药材的化学成分研究。诃子药材中含有大量乙酸、月桂酸等有机酸类成分, 总体表现出“酸”的复合嗅气。不同产地之间的诃子中挥发性成分的种类基本一致, 但在含量上存在一定差异, 提示不同产地的诃子中挥发性成分的累积可能存在地域特征, 但仍需用大样本量数据进一步验证。

本实验基于 HS-SPME/GC-QQQ-MS/MS 技术建立了一种诃子中 150 种挥发性成分快速筛查和定量分析方法, 具有高通量、快速、准确和简便的特点, 对其它中药材的挥发性成分分析具有参考价值。

志谢: 成都市荷花池中药材市场杨定明对样品收集做出的贡献, 成都市食品药品检验研究院文永盛主任中药师和成都市三勒浆药业集团樊三虎高级工程师对样品鉴定做出贡献。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015: 187.
- [2] 赵鹿, 廖翠萍, 杨秀娟, 等. 诃子的研究进展及质量标志物的预测 [J]. 中草药, 2020, 51(10): 2732-2744.
- [3] Sheng Z L, Zhao J H, Muhammad I, et al. Optimization of total phenolic content from *Terminalia chebula* Retz. fruits using response surface methodology and evaluation of their antioxidant activities [J]. *PLoS One*, 2018, 13(8): e0202368.
- [4] Chang C L, Lin C S. Phytochemical composition, antioxidant activity, and neuroprotective effect of *Terminalia chebula* retzius extracts [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2012, 2012: 125247.
- [5] Bag A, Kumar B S, Kumar P N, et al. Anti-inflammatory, anti-lipid peroxidative, antioxidant and membrane stabilizing activities of hydroalcoholic extract of *Terminalia chebula* fruits [J]. *Pharm Biol*, 2013, 51(12): 1515-1520.
- [6] Li K, Han X, Li R, et al. Composition, antivirulence activity, and active property distribution of the fruit of *Terminalia chebula* Retz. [J]. *J Food Sci*, 2019, 84(7): 1721-1729.

- [7] Sarabhai S, Sharma P, Capalash N. Ellagic acid derivatives from *Terminalia chebula* Retz. downregulate the expression of quorum sensing genes to attenuate *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 virulence [J]. *PLoS One*, 2013, 8(1): e53441.
- [8] Sheng Z, Yan X, Zhang R, et al. Assessment of the antidiarrhoeal properties of the aqueous extract and its soluble fractions of *Chebulae Fructus* (*Terminalia chebula* fruits) [J]. *Pharm Biol*, 2016, 54(9): 1847-1856.
- [9] Tasduq S A, Singh K, Satti N K, et al. *Terminalia chebula* (fruit) prevents liver toxicity caused by sub-chronic administration of rifampicin, isoniazid and pyrazinamide in combination [J]. *Hum Exp Toxicol*, 2006, 25(3): 111-118.
- [10] Sarkar R, Hazra B, Mandal N. Reducing power and iron chelating property of *Terminalia chebula* (Retz.) alleviates iron induced liver toxicity in mice [J]. *BMC Complement Altern Med*, 2012, 12: 144.
- [11] Aisala H, Sola J, Hopia A, et al. Odor-contributing volatile compounds of wild edible Nordic mushrooms analyzed with HS-SPME-GC-MS and HS-SPME-GC-O/FID [J]. *Food Chem*, 2019, 283: 566-578.
- [12] Xia Y, Zhang F, Wang W, et al. Analysis of volatile compounds from *Siraitia grosvenorii* by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry [J]. *J Chromatogr Sci*, 2015, 53(1): 1-7.
- [13] 张媛媛, 乾康, 高淑婷, 等. 高效液相色谱法测定不同产地藏药诃子中7种鞣质类有效成分的含量 [J]. *中国药理学杂志*, 2017, 52(12): 1073-1082.
- [14] 杨俊荣, 孙芳云, 李志宏, 等. 诃子的化学成分研究 [J]. *天然产物研究与开发*, 2008, 20(3): 450-451.
- [15] Dhanani T, Shah S, Kumar S. A validated high-performance liquid chromatography method for determination of tannin-related marker constituents Gallic acid, corilagin, chebulagic acid, ellagic acid and chebulinic acid in four *Terminalia* species from India [J]. *J Chromatogr Sci*, 2015, 53(4): 625-632.
- [16] 卢普平, 刘星堦, 李兴从, 等. 诃子三萜成分的研究 [J]. *植物学报: 英文版*, 1992, 34(2): 126-132.
- [17] Kundu A P, Mahato S B. Triterpenoids and their glycosides from *Terminalia chebula* [J]. *Phytochemistry*, 1993, 32(4): 999-1002.
- [18] 阳小勇, 唐荣平. 诃子化学成分的研究 [J]. *西昌学院学报: 自然科学版*, 2012, 26(2): 65-66.
- [19] 林励, 徐鸿华, 刘军民, 等. 诃子挥发性成分的研究 [J]. *中药材*, 1996, 19(9): 462-463.
- [20] 吴乌兰, 付芝, 金莲. 蒙药材诃子中挥发油化学成分的研究 [J]. *内蒙古民族大学学报: 自然科学版*, 2011, 26(3): 274-275.

[责任编辑 时圣明]