

川芎有效部位气相色谱-质谱研究与指纹图谱分析

梁明金, 贺浪冲*, 李永茂

(西安交通大学药学院, 陕西 西安 710061)

摘要: 采用气相色谱-质谱(GC/MS)联用技术, 利用NIST谱库分析、鉴定川芎有效部位中的主要化学成分。在GC/MS色谱条件下, 通过测定不同产地和不同批次的川芎药材样品, 参照相对峰面积分析确定指纹图谱中的共有峰。结果表明: 川芎有效部位中主要含有藁本内酯和亚丁烯邻苯二甲内酯等22种化学成分, 其中可用于指纹图谱定性分析的共有峰16个。包括有效成分在内的指纹图谱共有峰基本可以反映川芎有效部位的物质组成特性, 从而将有效地控制川芎药材质量。

关键词: 质谱学; 指纹图谱分析; 气相色谱-质谱(GC/MS); 川芎

中图分类号: O 657. 63; Q 949. 763 3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-2997(2004)03-150-05

Analysis of the Component and Fingerprint of Effective Part of Ligusticum Chuanxiong Hort by Gas Chromatography-Mass Spectrometry

LIANG Ming-jin, HE Lang-chong*, LI Yong-mao

(College of Pharmacy, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China)

Abstract: The components of lipophilic part of Ligusticum Chuanxiong Hort (LCH) were analyzed by use of gas chromatography/mass spectrometer (GC/MS) with NIST library. Under the chromatographic conditions, the samples of LCH from different place with different batch were measured and the common peaks in the fingerprint were confirmed. Twenty two compounds in lipophilic part of LCH were identified and sixteen of them will be used as common peaks of the fingerprint to control the quality of LCH. The fingerprint with active compounds can basically illustrate the composing character of lipophilic part of LCH and the quality of LCH can be controlled by this method.

Key words: mass spectrometry; study on Ligusticum Chuanxiong Hort; gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS); effective part; fingerprint

收稿日期: 2003-12-10; 修回日期: 2004-03-26

基金项目: 国家自然科学基金项目: 用细胞膜色谱法分析研究四物汤体系中的药效物质(20075020)

作者简介: 梁明金(1975~), 男(汉族), 山东潍坊市人, 博士, 主要从事中药作用物质基础研究与中药新药开发研究。

E-mail: Liangmj@mailst.xjtu.edu.cn

*通讯作者: 贺浪冲(1957~), 男(汉族), 教授, 博导, 长期从事药物分析基础研究和新药开发研究工作。

E-mail: helc@mailst.xjtu.edu.cn

川芎(*Rhizoma Chuanxiong*)为伞形科植物川芎*Ligusticum chuanxiong* Hort. 的干燥根茎,具有活血行气,祛风止痛之功效^[1],其中的生物碱和酚性成分有明显的扩张冠脉,抑制ADP诱导的血小板凝聚,降低血小板表面活性等作用^[2-4]。本文作者利用细胞膜色谱法^[5-7]结合离体药理实验对川芎中有效成分进行系统筛选研究,发现川芎有效部位中含有与犬心肌细胞膜及膜受体作用的活性成分,并对离体蛙心收缩力和心率有抑制作用。川芎化学成分的分析与鉴定方法很多^[8-10],近年来,GC/MS在中药有效成分鉴别和测定方面得到广泛应用^[11-13]。为深入研究川芎有效部位的药效物质基础,本工作拟在细胞膜色谱法筛选和离体药理实验验证基础上,采用GC/MS法对其化学成分进行鉴别分析,建立川芎有效部位的指纹图谱定性分析方法。

1 实验部分

1.1 主要仪器与装置

GC/MS-QP2010 气相色谱-质谱联用仪:日本 Shimadzu 公司产品,配有 GC/MS solution 色谱工作站和 NIST 质谱数据库;DB-5MS 毛细管柱:内径 30 m × 0.25 mm,粒径 0.25 μm,美国 Agilent(安捷伦)公司产品;HA 220-50-06 型超临界萃取装置:南通市华安超临界萃取有限公司产品。

1.2 主要试剂和样品

色谱纯正己烷:德国 Merck 公司产品;川芎药材:北京同仁堂、江西黄仁棧华氏大药房、上海蔡同德堂、广西南宁市中心医药连锁银珠商场、陕西西安藻露堂中药房、普太和中药店、前进大药房、众康大药房及陕西省药材市场(批号:20011207、20021006、20021102)提供,西安交通大学药学院生药教研室鉴定为伞形科植物川芎(*Ligusticum Chuanxiong* Hort.)的干燥根茎;藁本内酯(Ligustilide)标准品:本实验室自制,高效液相色谱(HPLC)法测定纯度 > 98%。

1.3 实验条件

1.3.1 色谱条件 DB-5MS(内径 30 m × 0.25 mm,粒径 0.25 μm)毛细管柱,载气为高纯氮气,程序升温:起始温度 80 °C,保持 2 min,以 10 °C/min 速率升温至 250 °C,保持 11 min;

1.3.2 质谱条件 进样口温度 250 °C;进样方式:分流进样;分流比 50;接口温度 250 °C;电子

轰击(EI)离子源温度 200 °C;采集总离子流(TIC);进样量 1.0 μL,流速 1.2 mL/min;溶剂延时时间 2.5 min。

1.4 分析溶液制备

1.4.1 藁本内酯标准液 称取藁本内酯标准品 20.1 mg,用正己烷溶解并定容至 50 mL,得每 1 mL 含藁本内酯 0.402 mg 的标准液。

1.4.2 有效部位供试液 取川芎药材样品粉碎,过 20 目筛,称取药粉 0.5 kg,置于 1 L 超临界 CO₂ 萃取釜中。开启制冷装置,萃取釜和分离釜加热装置,待达到设定温度后打开压缩泵,萃取釜压力保持为 20.0 MPa,温度为 40 °C,以 40 kg/h 流速循环萃取 3 h。从分离釜底部接收提取物,呈黄色油状,称重为 18.6 g,计算提取率为 3.72%。将川芎超临界萃取物作为川芎有效部位。取川芎有效部位约 40 mg,置于 10 mL 量瓶中,用正己烷溶解并定容至刻度,摇匀,过滤,取续滤液作为有效部位供试液。

1.4.3 GC/MS 测定方法 取藁本内酯标准液和有效部位供试液各 1.0 μL,在 1.3.1 项色谱条件下,注入 GC/MS 色谱仪测定。获得藁本内酯和有效部位供试液的总离子流色谱图(示于图 1),并以藁本内酯峰为对照,计算供试液中各色谱峰的相对保留时间(α),采用归一化法计算各色谱峰的相对峰面积(A_i%)。

1.5 方法学考察

1.5.1 精密度 取川芎(批号:20021102)有效部位供试液,精密吸取 1.0 μL 注入 GC/MS 色谱仪测定,记录其 GC/MS 总离子流色谱图,重复测定 6 次。结果相对峰面积大于 0.5% 的 16 个色谱峰的相对保留时间(α)的平均值 RSD 均小于 0.1%。

1.5.2 重现性 取川芎(批号:20021102)有效部位供试液 6 份,精密吸取 1.0 μL 注入 GC/MS 色谱仪测定,结果 16 个色谱峰的相对保留时间(α)的平均值 RSD 均小于 0.1%。

1.5.3 稳定性 取川芎(批号:20021102)有效部位供试液 1 份,分别于 0、2、6、12、24 和 48 h 各精密吸取 1.0 μL 注入 GC/MS 色谱仪测定,结果表明 16 个峰 α 值的平均值 RSD 均小于 0.1%。

1.6 指纹图谱建立

1.6.1 样品测定 在上述色谱条件下,测定 12 份不同产地和不同批次的川芎有效部位供试液,

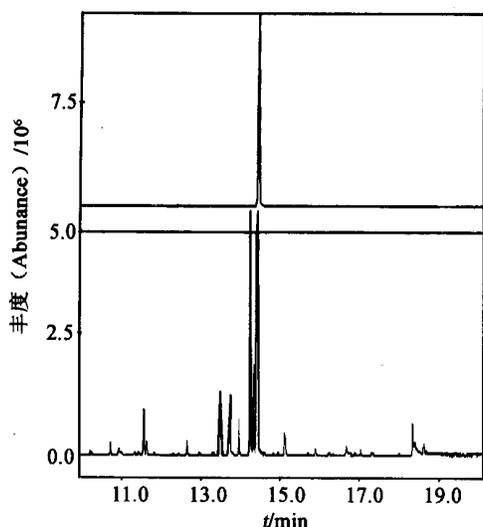


图 1 藁本内酯(a)和川芎有效部位
(b)的GC/MS色谱图

Fig 1 Chromatograms of Ligustilide (a) and
effective part of LCH (b) by GC/MS

a—藁本内酯(Ligustilide);

b—川芎有效部位(effective part of LCH)

记录其GC/MS总离子流谱图,计算不同样品中各色谱峰的 α 值和 $A_i\%$ 值。

1.6.2 共有峰确定 参照不同样品气相色谱图,计算相对峰面积大于0.5%的各色谱峰的相对保留时间 α 值和相对峰面积 $A_i\%$ 值。对至少9个样品(80%)中存在的色谱峰进行统计处理,由相对保留时间比较稳定的色谱峰(相对标准偏差小于0.1%)确定主要色谱峰有16个,其平均相对保留时间为0.758~1.323,分别计算12个样品中的上述16个色谱峰的相对峰面积及其平均标准偏差,结果证明各色谱峰化合物在样品中含量差别较大。鉴于上述16个色谱峰在样品中存在稳定,易于检出,故可以作为定性指标用于鉴定川芎药材。

2 结果与讨论

2.1 研究方法思路

超临界CO₂流体具有优于液体和气体的特性,如粘度小,渗透力强,可以渗入川芎药粉内部,与被提取成分充分接触,可以将脂溶性成分完全提取,且操作温度低(40℃),避免脂溶性成分的挥发和分解,可以快速有效提取川芎脂溶性成分,保证川芎脂溶性成分的稳定性和完整性。

GC/MS在中药有效成分鉴别和测定方面

得到应用的广泛,毛细管柱气相色谱法可以将中药脂溶性部位中易挥发且热稳定性成分有效分离,与质谱联用得到中药组分结构信息,结合标准品色谱图和谱库中化合物质谱图,可以分析并确定中药脂溶性部位的化合物结构。本工作采用GC/MS联用技术分析确定的川芎有效部位的化合物组成列于表1。此操作方法简单可行,结构分析清楚准确。

本中心利用具有生物活性的细胞膜制备色谱固定相,建立色谱筛选模型,已经广泛应用于中药活性成分的筛选^[14-16]。作者应用心肌细胞膜色谱模型对川芎活性成分进行筛选,再对其在离体器官和整体动物实验水平上进行验证,发现川芎中发挥药效的活性成分,并以有效成分藁本内酯为参照化合物,利用GC/MS联用技术建立川芎指纹图谱,控制川芎药材质量。由此从细胞水平、器官水平和整体水平阐明了川芎发挥临床治疗作用的物质基础,达到现代药物“成分明确、机理清楚、量效相关”的要求,为中药复杂组分分析提供了一种新的思路。

2.2 有效部位和参照化合物确定

采用细胞膜色谱法^[5-7]筛选了川芎超临界CO₂流体萃取物,发现其具有与犬心肌细胞膜及膜受体作用的特性,并对离体蛙心收缩力和心率有抑制作用。因此将川芎超临界CO₂流体萃取物确定为川芎对心肌细胞有生物活性的有效部位。

川芎超临界CO₂流体萃取物经硅胶柱层析和制备色谱法分离得到藁本内酯(纯度大于98%),参照GC/MS所得到的总离子流谱图可知其保留时间 t_R 为14.402 min,并得到色谱峰质谱图示于图2,解析质谱数据结果为(m/z , %): 190(M^+ , 66.3)、161($M^+ - C_2H_5$, 95.4)、148($M^+ - C_3H_6$, 94.9)、133($M^+ - C_3H_5O$, 24.1)、105($M^+ - C_4H_6O_2$, 76.5)、77($M^+ - C_6H_9O_2$, 46.5)。结合NIST谱库检索结果并参照紫外光谱、红外光谱数据和文献报道^[17,18]进一步验证其为藁本内酯。经犬心肌细胞膜色谱法筛选验证发现其与细胞膜及膜受体有活性作用,为川芎有效部位中活性成分之一,故将藁本内酯作为指纹图谱的参照化合物。

2.3 指纹图谱定性分析

通过不同产地和不同批次川芎有效部位供试品的GC/MS图谱,以藁本内酯为参照峰,确

定共有峰有 16 个, 其平均相对保留时间为 0.758 ~ 1.323, 其相对误差 ($RSD\%$) 均 < 0.1%。由上述 16 个色谱峰的相对峰面积及其平均标准偏差可知各色谱峰化合物在样品中含量差别较大, 但藁本内酯等主要化合物含量较高且稳定, 12 个

样品中的 16 个共有峰在 GC/MS 指纹图谱中的相对稳定, 可以反映川芎有效部位的组成特征, 可作为定性鉴别的指标参数用以控制川芎药材质量。

表 1 川芎有效部位成分分析结果

Table 1 Analytical result of the components in effective part of LCH

No	化合物 compound	R_t/m in	分子式 molecular formula	分子量/ D_a molecular weight
1	邻苯二甲酸二甲酯 dimethyl phthalate	10.928	$C_{10}H_{10}O_4$	194
2	eudesma-4(14), 11-diene	11.574	$C_{15}H_{24}$	204
3	3,5-二异丁基苯酚 3,5-ditertbutyl-phenol	11.635	$C_{15}H_{24}$	204
4	邻苯二甲酸二乙酯 diethyl phthalate	12.655	$C_{12}H_{14}O_4$	222
5	癸烷 decane	12.767	$C_{14}H_{30}$	198
6	1-(2,4-二甲苯基)-1-丙酮 [1-(2,4-dimethylphenyl)-1-propanone]	13.491	$C_{11}H_{14}O$	162
7	亚丁烯邻苯二甲内酯 butylidene phthalide	13.730	$C_{12}H_{12}O_2$	188
8	6-丁基-1,4-环庚酮 6-butyl-1,4-cycloheptadiene	13.959	$C_{11}H_{18}$	150
9	α -丁基苯甲醇 α -butyl-benzenemethanol	14.221	$C_{11}H_{16}O$	164
10	4-甲基-2-氨基吡啶 4-methyl-2-pyridinamine	14.328	$C_6H_8N_2$	108
11	藁本内酯 ligustilide	14.413	$C_{12}H_{14}O_2$	190
12	5,7,8-三甲基二氢香豆素 5,7,8-trimethyl-dihydrocoumarin	15.111	$C_{12}H_{14}O_2$	190
13	十四烷酸 tetradecanoic acid	15.636	$C_{14}H_{28}O_2$	228
14	邻苯二甲酸二丁酯 dibutyl phthalate	15.703	$C_{16}H_{22}O_4$	278
15	棕榈酸甲酯 palmitic methyl ester	16.345	$C_{17}H_{34}O_2$	270
16	十七烷酸 heptadecanoic acid	16.677	$C_{17}H_{34}O_2$	270
17	棕榈酸乙酯 hexadecanoic ethyl ester	17.028	$C_{18}H_{36}O_2$	284
18	9,12-十八碳二烯酸甲酯 9,12-octadecadienoic acid methyl ester	18.008	$C_{19}H_{34}O_2$	294
19	9-十八碳二烯酸甲酯 9-octadecadienoic acid methyl ester	18.069	$C_{19}H_{34}O_2$	296
20	9,12-十八碳二烯酸 9,12-octadecadienoic acid	18.348	$C_{18}H_{32}O_2$	280
21	9-十八碳二烯酸 9-octadecadienoic acid	18.400	$C_{18}H_{32}O_2$	282
22	十八烷酸 octadecanoic acid	18.626	$C_{18}H_{36}O_2$	284

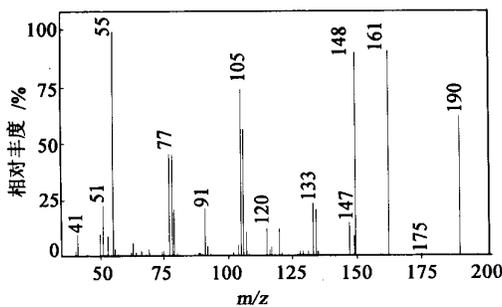


图 2 藁本内酯 GC/MS 质谱图

Fig 2 Mass spectrum of
Ligustilide by GC/MS

参考文献:

- [1] 中华人民共和国药典[S]. 2000年版(一部): 37.
- [2] 刘国勋, 吴铁, 陈志东, 等. 小鼠体内血栓形成动物模型的建立及在抗血栓药物筛选中的应用[J]. 中国应用生理学杂志, 1999, 15(3): 281~282.
- [3] Li Min, Shunosuke Handa, Yasuo Ikeda, et al. Specific Inhibiting Characteristics of Tetramethylpyrazine, One of the Active Ingredients of the Chinese Herbal Medicine 'Chuanxiong' on Platelet Thrombus Formation Under High Shear Rates [J]. Thrombosis Research, 2001, 104: 15~28.
- [4] Tsai Chinchuan, Lai Tungyuan, Huang Weichan, et al. Inhibitory Effects of Potassium Channel Blockers on Tetramethylpyrazine-induced Relaxation of Rat Aortic Strip in Vitro [J]. Life

- Sciences, 2002, 11(71): 1 321~ 1 330
- [5] 贺浪冲, 耿信笃 细胞膜受体色谱法-研究药物与受体作用的新方法[A]. 生物医药色谱新进展[C], 1996, 3: 8~ 9
- [6] He Langchong, Wang Sicen, Geng Xindu Coating and Fusing Cell Membrane Onto a Silica Surface and Their Chromatographic Characteristics [J]. Chromatographia, 2001, 54: 71~ 76
- [7] He Langchong, Yang Guangde, Geng Xindu Enzymatic Activity and Chromatographic Characteristics of the Cell Membrane Immobilized on Silica Surface [J]. Chinese Science Bulletin, 1999, 44(9): 826~ 831
- [8] Hong Zhangying, Wang Xuezhao, Le Jian, et al Supercritical Fluid Extraction of Essential Oil From Dry Rhizome of Ligusticum Chuanxiong Hort and Their Characterization by GC/MS [J]. Journal of Chinese Pharmaceutical Science, 2002, 11(2): 31~ 34
- [9] 周本杰, 张忠义, 石勇, 等. 超临界萃取和分子蒸馏联用技术提取分离川芎挥发性成分及其 GC/MS 分析[J]. 第一军医大学学报, 2002, 22(7): 652~ 653
- [10] 杨光明, 蔡宝昌, 潘扬, 等. 川芎药材指纹图谱研究与产地比较(I)[J]. 南京中医药大学学报, 2002, 3(18): 172~ 174
- [11] 吴玖涵, 聂凌云. 气相色谱-质谱联用技术在我国中药研究中的应用[J]. 解放军药学报, 2002, 18(2): 95~ 97
- [12] 袁久荣, 容蓉, 杨东. 当归饮片挥发油成分的研究[J]. 中国中药杂志, 1998, 23(10): 601~ 604
- [13] 梁鑫淼, 肖红斌, 卢佩章. 色谱联用技术在中药复方研究中的应用[J]. 世界科学技术-中药现代化, 2002, 2(4): 18~ 21
- [14] 赵惠茹, 杨广德, 贺浪冲. 用细胞膜色谱法筛选当归中的有效成分[J]. 中国药理学杂志, 2000, 35(1): 13~ 15
- [15] 赵小娟, 党高潮, 杨广德, 等. 淫羊藿根与叶活性成分的比较[J]. 分析化学, 2002, 30(8): 195~ 197
- [16] 高琨, 贺浪冲, 杨广德. 用细胞膜色谱法筛选研究红毛七中的有效成分[J]. 中国药理学杂志, 2003, 38(1): 14~ 16
- [17] Lin Longze, He Xianguo, Lian Lizhi, et al Liquid Chromatographic-Electrospray Mass Spectrometric Study of the Phthalides of Angelica Sinensis and Chemical Changes of Z-Ligustilide [J]. Journal of Chromatography A, 1998, 810: 71~ 79
- [18] 路新华, 梁鸿, 赵玉英. 当归中藁苯内酯类化合物的分离与结构鉴定[J]. 中国中药杂志, 28(5): 423~ 425

(上接第 133 页)

参考文献:

- [1] Wakui Y, Yanagisawa E, Ishibashi E, et al Determination of Baicalin and Baicalein in Rat Plasma by High-performance Liquid Chromatography With Electrochemical Detection [J]. J Chromatogr A, 1992, 575: 131~ 136
- [2] Wittig J, Herderich M, Graefe EU, et al Identification of Quercetin Glucuronides in Human Plasma by High-performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry [J]. J Chromatogr B, 2001, 753: 237~ 243
- [3] Jaeger W, Zembach B, Wolschann P, et al Metabolism of the Anticancer Drug Flavopiridol, A New Inhibitor of Cyclin Dependent Kinases in Rat Liver [J]. Life Sci, 1998, 62(20): 1 861~ 1 873
- [4] Abe KI, Inoue O, Yumoto E. Biliary Excretion of Metabolites of Baicalin in Rats [J]. Chem Pharm Bull, 1990, 38(1): 208~ 211
- [5] 车庆明, 黄新立, 李艳梅. 黄芩苷的药物代谢产物研究[J]. 中国中药杂志, 2001, 26(11): 768~ 769
- [6] 顾景凯, 钟大放, 陈笑艳, 等. LC-MSⁿ法鉴定乙氧苯柳胺在家兔体内的主要代谢产物[J]. 高等学校化学学报, 2000, 21(5): 690~ 693
- [7] 陈笑艳, 钟大放, 姜浩, 等. 电喷雾离子阱质谱法直接测定几种药物的葡萄糖苷酸型代谢物[J]. 药学学报, 1998, 33: 849~ 854
- [8] Lai M T, Hsiu S L, Hou Y C, et al Comparison of Metabolic Pharmacokinetics of Baicalin and Baicalein in Rats [J]. J Pharm Pharmacol, 2003, 55: 205~ 209