

本文引用:孙婉瑾,金实,段雪云,闫斌,白书仙,李成银,姜楠.基于HS-GC-MS技术的消肿I号挥发性成分指纹图谱研究[J].湖南中医药大学学报,2019,39(4):485-488.

基于HS-GC-MS技术的消肿I号挥发性成分 指纹图谱研究

孙婉瑾^{1,2},金实^{1,2},段雪云^{1,2},闫斌^{1,2},白书仙^{1,2},李成银^{1,2},姜楠^{1,2*}

(1.湖北省中医院,湖北 武汉 430061;2.湖北省中医药研究院,湖北 武汉 430074)

〔摘要〕 **目的** 建立消肿I号挥发性成分指纹图谱,以期为这一内病外治对抗癌性疼痛的中药制剂的进一步研究提供科学基础。**方法** 采用顶空静态加热萃取技术提取消肿I号低温易挥发性成分,采用顶空-气相色谱-质谱(HS-GC-MS)联用技术进行分析,使用Agilent HP-5MS毛细管色柱(0.25 μm×0.25 mm×30 m)分离;程序升温:初始温度60℃,保持5 min,以10℃/min升至120℃,保持3 min,以5℃/min升至170℃,保持5 min;分流进样,进样口温度150℃,进样量1 μL,载气为高纯氮气(纯度≥99.999%),载气流量1.0 mL/min,质谱条件为EI源,轰击电压70 eV,正离子模式,离子源温度230℃。**结果** 检验10批次样品,各批次相似度均在0.90以上,得到17个共有峰,分别进行识别与归属以及相对含量的计算。**结论** 消肿I号挥发性成分复杂,其中主要组成成分为仲丁基-1-丙烯基二硫化物、二烯丙基二硫醚等物质,同时含许多萜类促透皮吸收剂。

〔关键词〕 顶空-气相-质谱联用技术;挥发性成分;指纹图谱;消肿I号

〔中图分类号〕 R284.1

〔文献标志码〕 A

〔文章编号〕 doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2019.04.011

Study on Volatile Fingerprinting of Xiaozhong Ointment No. 1 by HS-GC-MS Technology

SUN Wanjin^{1,2}, JIN Shi^{1,2}, DUAN Xueyun^{1,2}, YAN Bin^{1,2}, BAI Shuxian^{1,2}, LI Chengyin^{1,2}, JIANG Nan^{1,2*}

(1. Hubei Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Wuhan, Hubei 430061, China; 2. Hubei Province Academy of Traditional Chinese Medicine, Wuhan, Hubei 430074, China)

〔Abstract〕 Objective To develop the volatile fingerprinting of Xiaozhong Ointment No. 1, thus providing a scientific basis for further study of the external preparation against internal cancer pain relief. **Methods** The low temperature volatile components of Xiaozhong Ointment No. 1 were extracted by using headspace static heating extraction technology. The headspace sampling-gas chromatography-mass spectrometry (HS-GC-MS) technology was used to analyze. Agilent HP-5MS column (0.25 μm×0.25 mm×30 m) was used and temperature programmed run was conducted: initial temperature 60℃, hold 5 min, 10℃/min rise to 120℃, hold 3 min, 5℃/min rise to 170℃, hold 5 min; split injection, inlet temperature: 150℃, injection volume 1.0 μL; carrier gas was high purity helium (≥99.999%), carrier gas flow 1.0 mL/min; mass spectrometry conditions: EI source, bombardment voltage 70 eV, positive ion mode, ion source temperature was set at 230℃. **Results** After analyzing 10 batches of samples, the similarity of all batches was over 0.90. 17 substances were identified and their relative contents were analyzed. **Conclusion** The volatile composition of Xiaozhong Ointment No. 1 is complex, and the main components are sec-butyl-cis-trans-1-propenyl disulfide, diallyl disulfide and other substances. It also contains many terpenes for transdermal absorption.

〔Keywords〕 HS-GC-MS technology; volatile components; fingerprint; Xiaozhong Ointment No. 1

〔收稿日期〕 2018-10-19

〔基金项目〕 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金资助项目(YZ-1850);湖北省自然科学基金项目(2011CDC031)。

〔作者简介〕 孙婉瑾,女,主管药师,硕士,研究方向:中药制剂、质量及其开发利用研究。

〔通讯作者〕 *姜楠,男,副主任技师,E-mail:1853763125@qq.com。

消肿 I 号是在名老中医理论指导下,本院长期使用的经验方,注重辨证与辨病相结合,针对癌性疼痛的主要发病机制,组方选药配制而成,在临床使用十余年,深受患者好评^[1-2]。有研究表明:消肿 I 号在治疗癌性疼痛、减轻癌性疼痛方面有显著功效,可以用来改善患者的生存质量^[3-4],然而关于其物质基础方面的研究较少。

消肿 I 号由三七、白首乌、阿魏三味药材组成,阿魏单独提取挥发油后,再与其他中药加水提取,最后与适宜基质混合制备成外用膏剂。经体表局部给药,通过皮肤吸收,达到镇痛作用。阿魏挥发油中含有单萜类、倍半萜类、多酚类、苯等化合物^[5-6],有很好的抗癌、抗炎、抗菌、抗氧化等作用^[7-10]。同时,关于中药挥发油类中活性成分透皮吸收促进作用的研究日益增多,其主要促渗活性成分多为单萜和倍半萜类化合物,该类天然促渗剂具有促渗作用强、起效快、不良反应小等特点^[11-14]。它们主要通过改变皮肤角质层细胞的有序排列、“拉动”效应以及增强皮肤角质层水合作用等机制发挥促渗作用^[15]。本研究拟采用顶空-气相色谱-质谱联用(HS-GC-MS)方法建立消肿 I 号挥发性成分指纹图谱,确立共有特征峰,并进行指认。对其中可能的活性成分和起透皮吸收促进作用的成分进行定性分析,为这一治疗癌性疼痛的中药外用制剂的后续开发提供基础与依据。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Agilent 7890A-5975C 气相质谱联用仪(美国 Agilent 公司),包括 7697A 顶空进样器、G4513A 自动进样器、NIST17 质谱数据库、Agilent Masshunter Qualitative Analysis 定性工作站。真空机械泵(德国 Pfeiffer Vacuum 公司),高纯氦气(纯度 $\geq 99.999\%$)(武汉华星工业技术有限公司),ES225SM-DR 十万分之一电子天平(瑞士 Precisa 公司)。

1.2 试药

三七、阿魏白首乌均经湖北省中医院主任药师段雪云鉴定。三七为五加科植物三七 *Panax notoginseng* (Burk.) F.H.Chen 的干燥根和根茎;阿魏为伞形科植物新疆阿魏 *Ferula sinkiangensis* K. M. Shen 的树脂;白首乌为萝藦科植物耳叶牛皮消 *Cynanchum auriculatum* Royle ex Wight 的干燥块根。

阿魏单独提取挥发油后,再与三七、白首乌一同加水提取,最后提取物与适宜基质混合并加入挥发油制备成消肿 I 号。实验用的 10 批消肿 I 号(见表 1)均由湖北省中医院制剂中心生产。

表 1 消肿 I 号编号信息

编号	批号	编号	批号
S1	20181010	S6	20180105
S2	20180903	S7	20171117
S3	20180701	S8	20170907
S4	20180502	S9	20170713
S5	20180308	S10	20170425

2 方法与结果

2.1 挥发性成分的提取

称取消肿 I 号供试品 3.0 g,准确称定,置于 10 mL 顶空瓶中密闭,置顶空进样器中按以下条件进样:样品瓶加热温度 100 °C,定量环 105 °C,传输线 110 °C,加热 15 min,提取消肿 I 号低温易挥发性成分进行分析。

2.2 气相及质谱条件

使用 Agilent HP-5MS 毛细管色柱(0.25 $\mu\text{m} \times 0.25 \text{ mm} \times 30 \text{ m}$);程序升温:初始温度 60 °C,保持 5 min,以 10 °C/min 升至 120 °C,保持 3 min,以 5 °C/min 升至 170 °C,保持 5 min;载气为高纯氦气(纯度 $\geq 99.999\%$),载气流量 1.0 mL/min;分流比 25:1,进样口温度 150 °C,进样量 1 μL 。质谱条件为 EI 源,轰击电压 70 eV,正离子模式,离子源温度 230 °C,四级杆温度 150 °C,采用全扫描模式获得样品的总离子流色谱图^[16]。

2.3 重复性试验

取 2 号样品 5 份顶空进样器分别进样,各图谱的相似度均在 0.996 以上,说明本试验方法重复性良好。

2.4 指纹图谱共有模式建立与各样本之间相似度分析

按照“2.1”及“2.2”所述条件测定各批次消肿 I 号挥发性成分,提取电元文件,导入国家药典委员会中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件(2012A 科研类)进行指纹图谱数据分析和处理,设定样品 1 为参照图谱,建立消肿 I 号挥发性成分共有模式对照指纹图谱(见图 1)与 10 批消肿 I 号挥发性成分总

离子流色谱叠加图(见图2),并得到17个共有峰,10批指纹图谱相似度计算结果见表2;谱库检索结合文献^[5-6,17]进行识别,相应信息见表3;识别出12号峰为仲丁基-1-丙烯基二硫化物,为阿魏挥发油中主要成分,来源明确,归属可靠,并且在气相色谱图中分离较好。

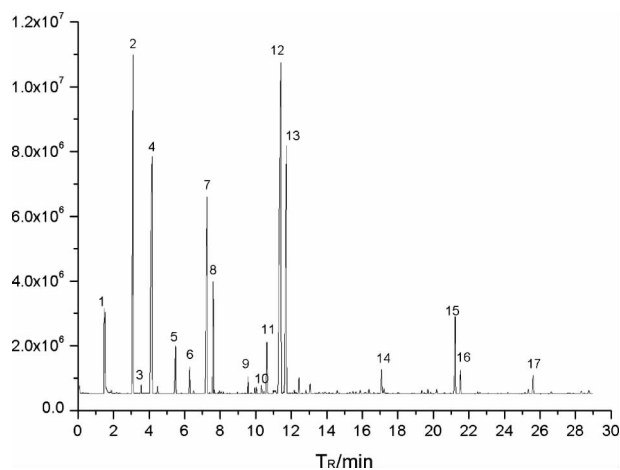


图1 消肿I号挥发性成分总离子共有图谱

3 讨论

目前,HS-GC-MS技术判断化合物信息的手段主要是通过谱库检索匹配度打分结合文献报道,当两者吻合,则该化合物被识别正确的概率就非常高,因而可以被确证。本研究识别出的17个共有峰中,2-9、12-17峰均有相关文献支持来自阿魏,加上谱库检索匹配度打分均大于80,我们可以识别为表3

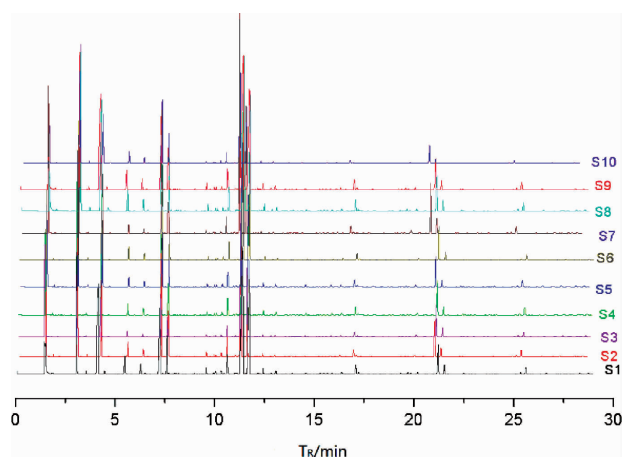


图2 10批消肿I号挥发性成分总离子流色谱叠加图

表2 10批消肿I号挥发性成分总离子流指纹图谱相似度

样品编号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10
相似度	0.942	0.960	0.969	0.938	0.925	0.931	0.928	0.921	0.912	0.922

列出的相应成分。而1、10、11号峰暂时没有文献报道,识别信息仅来自谱库检索,来源归属信息有待进一步研究。

仲丁基-1-丙烯基二硫化物约占阿魏挥发油总量的50%左右^[18],具有辛通温开,解毒脱瘾的功效,为本文测得消肿I号低温挥发性成分中含量最高的物质。二烯丙基二硫醚含量次之,是一种潜在的广谱抗癌药,被报道在大蒜中分离得到,有可能是阿魏挥发油中硫醚化合物转化而成,或者直接来源于阿魏挥发油,是其蒜臭味物质基础之一^[19]。这两种物质在

表3 共有峰化合物信息

序号	保留时间/min	化学名称	分子式	相对含量/%
1	1.432	Methanethiol(甲硫醇)	CH ₄ S	0.602
2	3.094	(+)- α -Pinene((+)- α -蒎烯)	C ₁₀ H ₁₆	1.328
3	3.554	7,7-dimethyl-3-methylidenebicyclo[2.2.1]heptane(7,7-二甲基-2-亚甲基-双环[2.2.1]庚烷)	C ₁₀ H ₁₆	0.021
4	4.208	β -Pinene(β -蒎烯)	C ₁₀ H ₁₆	1.203
5	5.628	2-Carene(2-薷烯)	C ₁₀ H ₁₆	0.209
6	6.342	(4R)-limonene(D-柠檬烯)	C ₁₀ H ₁₆	0.097
7	7.267	(3E)-3,7-Dimethyl-1,3,6-octatriene((3E)-3,7-二甲基辛-1,3,6-三烯)	C ₁₀ H ₁₆	1.337
8	7.626	(E)- β -ocimene(罗勒烯)	C ₁₀ H ₁₆	0.466
9	9.597	(4E,6Z)-2,6-dimethylocta-2,4,6-triene(别罗勒烯)	C ₁₀ H ₁₆	0.052
10	10.435	Tetradecane(正十四烷)	C ₁₄ H ₃₀	0.040
11	10.632	(E)-tetradec-3-ene((3E)-3-十四碳烯)	C ₁₄ H ₂₈	0.205
12	11.353	sec-butyl-cis-trans-1-propenyl disulfide(仲丁基-1-丙烯基二硫化物)	C ₈ H ₁₈ S ₂	3.571
13	11.677	Diallyl disulfide(二烯丙基二硫醚)	C ₆ H ₁₀ S ₂	1.865
14	17.075	Nerolidol(橙花叔醇)	C ₁₅ H ₂₆ O	0.186
15	21.193	Famesene(金合欢醇)	C ₁₅ H ₂₆ O	0.816
16	21.535	β -eudesmol(β -桉叶醇)	C ₁₅ H ₂₆ O	0.183
17	25.604	Guaiol(愈创木醇)	C ₁₅ H ₂₆ O	0.138

功效方面与消肿 I 号治疗癌性疼痛吻合,有利于抗癌治疗顺利实施。同时,外敷贴剂止痛,不仅方便,而且易为患者接受。特别是晚期癌症患者正气已虚,不耐攻伐,脾胃吸收功能减弱,单靠内服药效果不佳,中药外治更具优势。检测出蒎烯、萜烯等萜类化合物为经皮给药制剂天然的促渗剂。本文结果提示,本品在使用前适当隔水加热,有利于挥发性物质溢出,能达到更好的促进吸收效果。

在采集各批次制剂样品时,能明显发现 6 号样品与其它样品颜色有差异,颜色与其它样品相比偏浅,曾怀疑其存在质量问题。但经过检查,其制备流程不存在问题,临床疗效也与其他批次无异,在气质指纹图谱中能发现 3 号样品与其它样品的指纹图谱相似度均 ≥ 0.9 ,与共有指纹图谱相似度为 0.931,相似度较高,验证了指纹图谱是制剂质量稳定性评价的手段的科学性。本研究所建立的消肿 I 号挥发性成分气质指纹图谱,较大程度地反映了消肿 I 号挥发性成分的组成情况,除了揭示其挥发性物质基础,还可用于控制其质量的稳定性、均一性,对提高该制剂的质量控制标准有着重要意义。

参考文献

- [1] 罗兰.消肿 I 号方外敷治疗轻中度癌性疼痛的临床研究[D].长沙:湖北中医药大学,2010.
- [2] 罗兰.消肿 I 号外敷治疗癌性疼痛的临床观察[J].湖北中医杂志,2010,32(5):48.
- [3] 杨春娣.消肿 I 号治疗癌性疼痛的效果观察[J].中国临床护理,2016,8(4):351-353.
- [4] 李成银,罗秀丽,王琦苑,等.见肿消巴布剂治疗癌性疼痛的临床研究[J].湖北中医药大学学报,2016,18(3):87-89.
- [5] 王珊,柯瑾,蒲旭峰.阿魏挥发油成分 GC 指纹图谱研究[J].中成药,2008,30(4):472-475.
- [6] 盛萍,王飒,苗莉娟,等.不同方法提取的多伞阿魏挥发油化学成分及其体外抗胃癌活性比较[J].中成药,2013,35(11):2442-2448.
- [7] TIAN C, XIE L Q, GUAN L I. Germination characters of the seeds of the *Ferula sinkiangensis* K. M. Shen[J]. Seed, 2008, 27(5):88-90.
- [8] WILKEN R, VEENA M S, WANG M B, et al. Curcumin: A review of anti-cancer properties and therapeutic activity in head and neck squamous cell carcinoma[J]. Molecular Cancer, 2011, 10(1):12.
- [9] 李健,滕亮,戴秀勇,等.阿魏挥发油微囊的制备及初步热稳定性研究[J].中国医药工业杂志,2010,41(10):748-751.
- [10] ZHANG H, LU J, ZHOU L, et al. Antioxidant and antitumor effects of *Ferula sinkiangensis* K. M. Shen [J]. International Journal of Clinical & Experiment, 2015, 8(11): 20845.
- [11] AKTHAR M S, DEGAGA B, AZAM T. Antimicrobial activity of essential oils extracted from medicinal plants against the pathogenic microorganisms: A review[J]. Issues in Biological Sciences and Pharmaceutical Research, 2014,2(1):1-7.
- [12] KUNNUMAKKARA A B, BORDOLOI D, PADMAVATHI G, et al. Curcumin, the golden nutraceutical: multitargeting for multiple chronic diseases[J]. British Journal of Pharmacology, 2017, 174(11): 1325-1348.
- [13] LATIFI G, GHANNADI A, MINAIYAN M. Anti-inflammatory effect of volatile oil and hydroalcoholic extract of *Rosa damascena* Mill. on acetic acid-induced colitis in rats[J]. Research in Pharmaceutical Sciences, 2015,10(6):514.
- [14] ALI B, AL-WABEL N A, SHAMS S, et al. Essential oils used in aromatherapy: A systemic review[J]. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 2015,5(8): 601-611.
- [15] 李莉,韩国柱.中草药挥发油类透皮吸收促进作用研究进展[J].中国新药杂志,2008,17(11):914-918,946.
- [16] 钟秋萍,钟兆健,陈晓东,等.SHS-GC-MS 联用结合保留指数分析沉香香气成分[J].医药导报,2016,35(11):1234-1249.
- [17] 任燕.新疆阿魏毒性的谱效关系以及 Caco-2 细胞模型的吸收特性研究[D].乌鲁木齐:新疆医科大学,2014.
- [18] 王珊,柯瑾,蒲旭峰.阿魏挥发油中仲丁基-1-丙烯基二硫化物对照品的制备[J].中国药事,2008,22(10):889-891.
- [19] 张晓云,许博文,全乐,等.蒜素抗肿瘤作用机制的研究进展[J].华北理工大学学报(医学版),2017,19(2):165-167.

(本文编辑 苏维)