

文章编号:1006-6144(2007)06-0631-06

转换移动窗口因子分析法用于中药组合前后成分变化分析

周 能^{1,2}, 梁逸曾^{*1}, 王 平¹, 曾茂茂¹

(1. 中南大学化学化工学院, 中草药现代化研究中心, 长沙 410083;

2. 玉林师范学院化学与生物系, 广西玉林 537000)

摘 要:以正十四烷为内标, 采用气相色谱-质谱 (GC/MS) 联用技术对中药甘草 (GUF)、甘遂 (EKL) 单味药材, 以及其组成的药对 (GUF-EKL) 的挥发成分进行测定, 基于一种新的化学计量学方法——转换移动窗口因子分析法 (AMWFA) 和直观推导式演进特征投影法 (HEL P) 对产生的二维色谱/质谱数据同时进行分辨和解析, 获取各个组分的纯色谱曲线和质谱, 根据分辨得到的纯质谱在质谱库中进行相似检索以实现组分定性。利用 AMWFA 对组合前后的成分进行归属分析, 然后采用面积归一法进行定量。分别在甘草、甘遂及其药对中鉴定出 52、51 和 63 个成分, 占各自挥发油成分的 84 %、90 % 和 75 %。

关键词:转换移动窗口因子分析法; 甘草; 甘遂; 挥发成分; 气相色谱/质谱

中图分类号: O657.63

文献标识码: A

在实现中药现代化的进程中, 要对中药进行物质基础的研究^[1,2]。复方是一个相当复杂的体系, 因此, 不管色谱条件如何优化, 总会有很多重叠峰, 直接检索方法可能因为没有进行背景扣除而有误差或者遇到异常峰, 或者得到的是混合物的质谱而难于得到准确的检索结果。

本文利用气相色谱-质谱 (GC/MS) 检测, 并利用由本研究中心开发的一种新化学计量学方法——转换移动窗口因子分析法 (AMWFA)^[3] 和直观推导式演进特征投影法 (HEL P)^[4] 对甘草、甘遂单味药和二者组成的药对产生的二维色谱/质谱数据进行解析和比较, 得到各个组分的纯色谱曲线和质谱, 继而依据质谱库对分辨的纯组分进行定性检索, 同时加入正十四烷作为内标, 并用面积归一法进行定量, 以某成分相对含量/正十四烷相对含量作为定量比较指标。初步对甘草、甘遂和甘草-甘遂反药对的化学物质及其变化进行了系统的比较研究。

1 实验部分

1.1 仪器与药品

GC-17A Shimadzu 气相色谱仪; QP-5000 Shimadzu 质谱仪。

甘草 (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch, GUF)、甘遂 (*Euphorbia kansui* Lion, EKL) 购自广西玉林市中药材市场, 并经湖南师范大学医学院生药学赵冰清教授鉴定。

1.2 挥发油的提取

分别称取干燥的甘草、甘遂并固定甘遂质量为 50 g, 将二者组成甘草/甘遂为 1:1、2:1 和 1:2 的药对, 根据中华人民共和国药典 (1995 年版) 中的标准方法^[5] 提取挥发油。挥发油取出后加入等量的正十四烷, 然后以正己烷定容至 2 mL (含正十四烷 0.2 μ L), 供 GC/MS 测定。

1.3 挥发油的测定条件

色谱条件: OV-17 30 m $\times$ 0.25 mm 石英毛细管柱。程序升温: 起始温度 60 $^{\circ}$ C, 维持 4 min, 以 2 $^{\circ}$ C/min

收稿日期: 2006-12-15

修回日期: 2007-01-24

基金项目: 国家自然科学基金重点项目 (No. 20235020)

通讯联系人: 梁逸曾, 男, 教授, 博士生导师, 研究方向: 化学计量学和中药现代化。

升至 66 ,维持 3 min,以 2 /min 升至 70 ,维持 3 min,以 3 /min 升至 100 ,维持 1 min,以 4 /min 升至 130 ,维持 2 min,以 5 /min 升至 190 ,并在此和 160 各维持 1 min,以 3 /min 升至 220 维持 1 min,最后以 6 /min 升至 250 。载气:He,流速 1.5 mL ·min⁻¹;进口温度 250 ,接口温度 280 。

质谱条件:EI 源电子能量 70 eV,离子源温度:200 。倍增电压:0.8 kV,扫描范围 40 ~ 400 amu;溶剂延迟 4 min。

2 理论部分

假定 X 和 Y 分别代表中药复杂体系单味药及其组成药对的二维数据(GC/MS 等)量测矩阵中某一保留时间下的子矩阵,AMWFA 在解析纯质谱过程中充分利用了隐藏于两个体系中的选择性信息,即分别将 X 和 Y 当作基数据(Base Data)和目标数据(Target Data),进行多组分光谱相关色谱分析(MSCC)^[6],然后反过来分别将 X 和 Y 当作目标数据和基数据,进行反向多组分光谱相关色谱分析(IP-MSCC)^[3]。应用这两种方法进行分析即可得到 X 与 Y 中成分的对对应关系。随后, X 和 Y 经过 SVD 分解分别获得两个正交的载荷矩阵 E 、 F ,由 E 、 F 构建判别函数,确定 X 和 Y 的共有组分数。最后,进行共有组分纯质谱解析:采用移动窗口技术对目标矩阵进行扫描,得到色谱保留时间与特征值 d_k 关系的共有组分秩图。然后在移动窗口扫描过程中,通过公式 $s = \sum a_i e_i = \sum b_j f_j = Ea = Fb$,得到各个时间点的质谱和相邻两点质谱的相似度。由此,获得一条保留时间与质谱相似度的曲线,即质谱自相关曲线。结合共有组分秩图信息和质谱自相关曲线中相似度为 1 的范围可以确定目标组分的纯质谱。详细原理参见文献[3]。

3 结果与讨论

3.1 挥发油化学成分的定性和比较分析

中药挥发油的成分相对复杂,从总离子流图(图 1)可以看出,除两组大峰外,其余均为小峰,其中相对含量在 0.1 % 以上的峰有 100 多个。

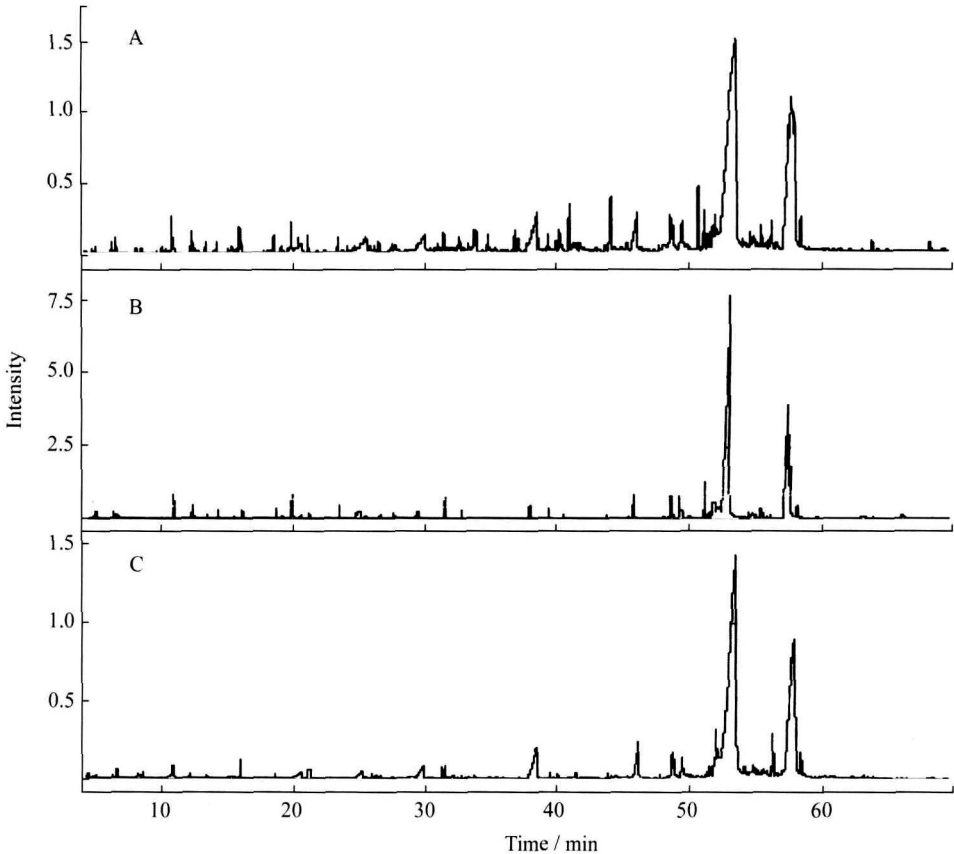


Fig.1 Total ion current (TIC) curve
A: GUP-EKL; B: GUF; C: EKL.

图 2 ~ 5 是运用 AMWFA 法对甘遂单味药和其与甘草(1 1)的药对在保留时间 56.3 min 附近的峰族

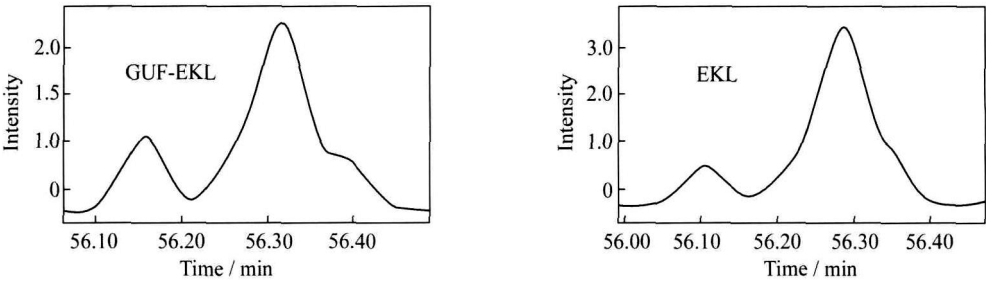


Fig. 2 Total ion current (TIC) curve of volatile of GUF-EKL (1 1) and EKL around 56.3 min

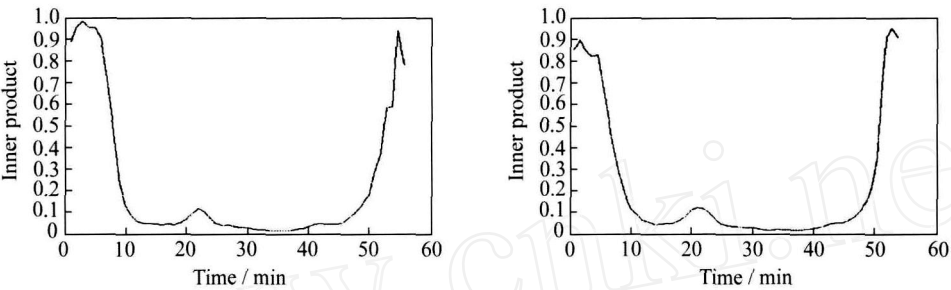


Fig. 3 Results of MSCC and IP-MSCC analysis of EKL (left) and GUF-EKL (right)

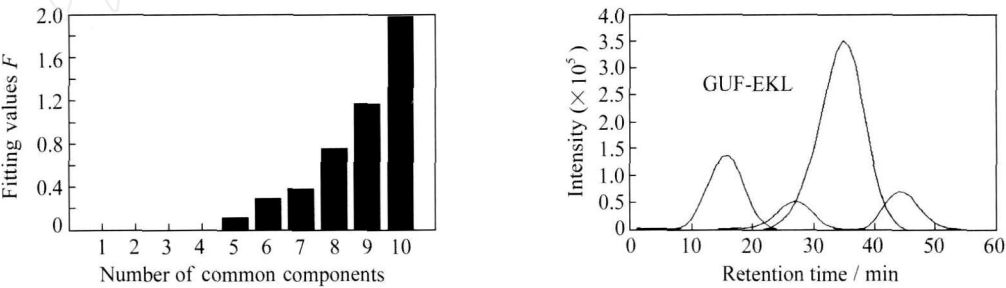


Fig. 4 Results of AMWFA
Left :numbers of common components; Right :resolved chromatographic curves.

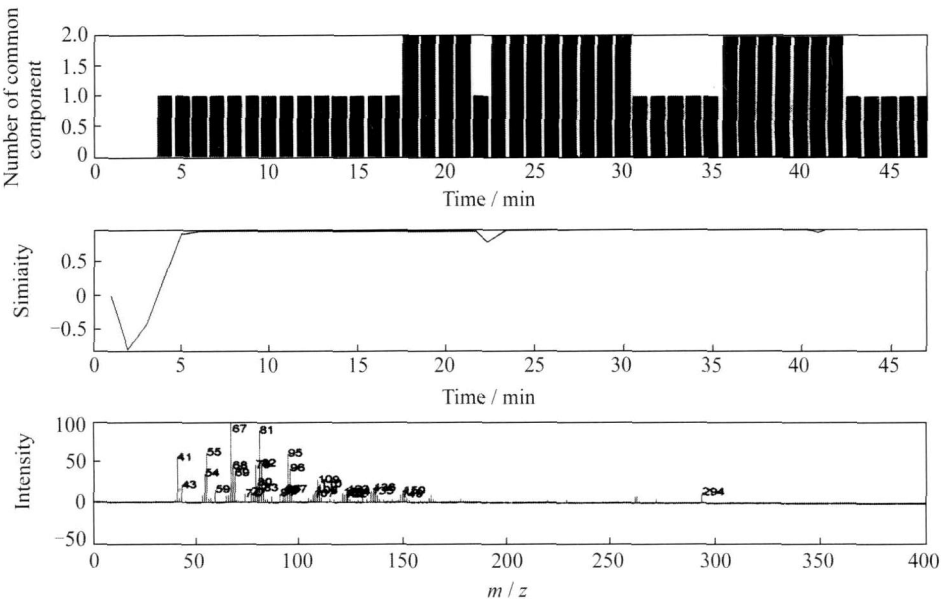


Fig. 5 Extraction of pure MS spectrum

进行比较和解析,首先运用子空间比较法和奇异值法都显示有四种成分(数据没显示);图 3 用 MSCC 和 IP-MSCC 进行处理,显示甘遂单味药和其与甘草(1 1)的药对相互全部包含对方成分;图 4 则以拟合值(Fitting Values)给出了共有组分的数目为 4,并解析得到相应的色谱图;图 5(上)显示该保留时间段内不同时间点的组分数,(中)表示相似度,(下)则是最左边峰的解析结果(纯质谱)(通过点击与 1 组分区所对应的相似度较大的区域即可获得结果),经检索可以进行定性。而对甘草单味药和它与甘遂(1 1)和药对在该位置的色谱进行同样处理,结果只有一个共有组分。对所有峰同时用 HEL P 法和 AMWFA 法同时进行处理,得到一致的结果。一些在 1 1 方剂中信噪比很低的峰利用 1 2 或 2 1 的配比予以解决。而利用本研究中心开发的中药相似性评价软件对 1 1、1 2、2 1 的药对的图谱进行相似度评价,相似度(峰位置)在 0.95 以上,说明实验方法可靠。总的解析结果见表 1。

3.2 挥发油化学成分的定量分析

采用面积归一法求挥发油中各组分的相对含量,由于每份挥发油试样加入了等量的内标,利用各组分含量与内标含量之比作为药物配伍前后成分变化的指标更具合理性。对 50 g 的甘草、甘遂及其各 50 g 单味药组成的反药对进行分析,取相似度大于 90 %的成分,结果见表 1。

Table 1 Chemical components of volatile oils from to GUF, EKL and GUF-EKL

Name of component/ Molecular formula	RC/ RT		
	GUF	EKL	GUF-EKL
2,4-Dimethyl-hexane/ C8H18	—	0.179/ 4.358	0.061/ 4.375
2- Hexenal/ C6H10O	0.222/ 4.950	—	0.152/ 4.989
2- Heptanone/ C7H14O	0.259/ 6.167	0.214/ 6.192	0.485/ 6.217
Heptahal/ C7H14O	0.247/ 6.533	0.643/ 6.550	0.545/ 6.575
Benzaldehyde/ C7H6O	0.136/ 8.492	0.464/ 8.500	0.364/ 8.525
4- Methylene- 1- (1- methylethyl)- bicycol[3. 1. 0]	0.049/ 8.824	—	0.061/ 8.858
hex-2- ene ,/ C10H14			
1-Octen-3-one/ C8H14O	0.086/ 9.675	0.071/ 9.700	0.121/ 9.725
2,5-Octanedione/ C8H14O2	0.148/ 9.917	—	0.182/ 9.950
6- Methyl-5- hepten-2- one ,/ C8H14O	0.148/ 10.017	0.143/ 10.042	0.273/ 10.067
Hexanoic acid/ C6H12O2	0.259/ 10.283	—	—
2- Pentyl-furan/ C9H14O	1.062/ 10.758	1.000/ 10.783	1.636/ 10.808
Octanal/ C8H16O	—	0.571/ 10.858	0.757/ 10.858
Benzeneacetaldehyde/ C8H8O	—	0.500/ 12.108	0.091/ 12.142
4- Carene/ C10H16	0.309/ 12.167	—	0.394/ 12.217
1- Methyl- (1- methylethyl)- benzene/ C10H14	0.593/ 12.300	—	0.818/ 12.350
3,5-Octadien-2-ol/ C8H14O	0.185/ 12.458	0.107/ 12.467	0.303/ 12.500
2-Octenal/ C8H14O	0.272/ 13.333	0.321/ 13.342	0.515/ 13.375
Gamma. - Terpinen/ C10H16	0.519/ 14.167	—	0.455/ 14.208
Heptanoic acid/ C7H14O2	—	0.357/ 15.283	—
Nonanal/ C9H18O	0.358/ 15.892	1.464/ 15.925	1.152/ 15.958
3,7-Dimethyl- 1,6-octadien-3-ol/ C10H18O	0.469/ 16.008	—	0.788/ 16.075
2- Nonenal/ C9H16O	0.543/ 18.525	0.357/ 18.533	0.909/ 18.583
3- Thujen-2-one/ C10H14O	0.198/ 19.075	—	0.303/ 19.133
1,6- Methano [10] annulen-11-one/ C10H18O	0.074/ 19.608	—	0.273/ 19.650
4- Methyl- (1- methyl)-3-cyclohexen-1-ol/ C10H18O	1.519/ 19.825	—	2.09/ 19.900
p- Menth-1-en-8-ol/ C10H18O	0.247/ 20.400	—	1.03/ 20.450
Octanoic acid/ C8H16O2	—	1.929/ 20.500	0.545/ 20.742
Decanal/ C10H20O	0.407/ 21.083	0.679/ 21.100	0.909/ 21.142
4- (1- Methylethyl)-1-cyclohexene-1-carboxaldehyde/ 10H16O	0.160/ 24.117	—	0.364/ 24.158
Nonanoic acid/ C9H18O2	1.025/ 24.993	2.357/ 25.217	1.727/ 25.200
2- Undecanone/ C9H18O2	0.049/ 25.475	0.179/ 25.492	—
4- Ethenyl-2-methoxy-phenol/ C9H10O2	0.160/ 25.842	0.464/ 25.858	0.576/ 25.892

(续表 1)

Name of component/ Molecular formula	RC/ RT		
	GUF	EKL	GUF-EKL
2,4-Decadienal/ C10H16O	0.198/ 26.179	0.357/ 26.192	0.576/ 26.242
Dihydro-5-pentyl-2(3H)-furanone/ C9H16O2	0.321/ 27.475	0.179/ 27.492	0.455/ 27.550
Decanoic acid/ C10H20O2	0.951/ 29.400	4.964/ 29.917	4.000/ 30.100
1-(2-Hydroxy-4-methoxyphenyl)-ethanone/ C9H10O3	—	1.036/ 31.258	0.364/ 31.292
Tetradecane (internal standard)/ C14H30	1.000/ 31.450	1.000/ 31.458	1.000/ 31.492
5,9-Undecadien-2-one,6,10-dimethyl-/ C13H22O	0.420/ 32.650	0.250/ 32.667	0.970/ 32.725
Undecanoic acid/ C11H22O2	—	0.357/ 33.750	—
Eudesma-4(14),11-diene/ C15H24	—	—	1.000/ 34.858
8a-Dimethyl-7-(1-methylethenyl)-naphthalene, 1,2,3,5,6,7,8,8a-octahydro-1-/ C15H24	—	—	1.091/ 36.892
Dodecanoic acid/ C12H24O2	1.469/ 37.867	12.286/ 38.450	8.515/ 38.558
8,Beta. H-cedran-8-ol/ C15H26O	0.642/ 39.350	0.500/ 39.367	1.121/ 39.408
Octadecane/ C18H38	0.198/ 39.989	0.357/ 39.992	0.788/ 40.075
Spathulenol/ C15H24O	0.272/ 40.380	—	0.515/ 40.450
Dihydro-5-octyl-2(3H)-furanone,/ C12H22O2	—	0.500/ 41.342	0.545/ 41.398
Tetradecanal/ C14H28O	0.284/ 43.692	0.500/ 43.708	0.606/ 43.771
Dibenzo-7,8-diazabicycol[2.2.2]octa-2,5-diene/ C14H12N2	0.247/ 45.325	0.321/ 45.342	0.697/ 45.408
Tetradecanoic acid/ C14H28O2	2.457/ 45.783	9.179/ 46.083	6.788/ 46.175
Docosane/ C22H46	0.086/ 47.792	0.321/ 47.800	0.455/ 47.842
Cyclopentadecanone,2-hydroxy-/ C15H28O2	0.370/ 48.781	2.821/ 48.808	3.121/ 48.868
Pentadecanoic acid/ C15H30O2	0.346/ 49.300	4.143/ 49.442	3.152/ 49.558
7,11,15-Trimethyl-3-methylene-hexadeca-1,6,10,14-tetraene/ C20H32	—	0.500/ 51.275	0.252/ 51.325
Hexadecanoic acid,methyl ester/ C17H34O2	—	0.964/ 51.400	1.000/ 51.442
Hexadecanoic acid/ C16H32O2	51.38/ 52.858	167.7/ 53.642	98.33/ 53.708
Hexadecadienoic acid, methyl ester/ C17H30O2	0.444/ 54.367	0.679/ 54.627	1.492/ 54.742
9,12,15-Octadecatrien-1-ol/ C18H32O	—	0.357/ 54.707	0.481/ 54.825
9-Octadecenal/ C18H34O	—	0.893/ 54.850	0.611/ 55.033
Octadecadienoic acid, methyl ester/ C19H34O2	0.173/ 56.058	0.643/ 56.367	0.667/ 56.158
9,12,15-octadecetrienic acid, methyl ester/ C19H32O2	0.049/ 56.167	—	0.142/ 56.400
9,12-Octadecadienoic acid/ C18H32O2	17.95/ 57.292	50.68/ 57.700	43.39/ 57.592
9,12-Octadecadien-1-ol/ C18H34O	2.642/ 57.358	13.36/ 57.783	4.394/ 57.976
9-Octadecenoic acid/ C18H34O2	5.975/ 57.458	16.93/ 57.892	8.273/ 58.058
Octadecanoic acid/ C18H36O2	0.876/ 58.083	2.964/ 58.333	2.182/ 58.482
9-Tricosene/ C23H46	—	0.250/ 62.175	0.212/ 62.217
1-Pentacosanol/ C25H52O	—	1.286/ 68.050	0.515/ 68.100
Tetratriacontane/ C34H70	—	0.178/ 69.008	0.091/ 69.008

Note:RC, relative content(%);RT,retention time(min) .

4 单味药与药对之间挥发性成分的比较

内标正十四烷的保留时间稳定在 31.450 min 附近,它在各药的挥发油中的归一化相对含量分别为甘草 0.81%,甘遂 0.28%,1 1药对 0.33%。甘草、甘遂中含有大量的相同成分,单味药中存在的成分在药对中大多都能检测到,只是由于药对中成分更为复杂,使得一些含量低的成分难于检测。从总体上看,同一成分在药对中的含量有 60%小于两种单味药中含量之和,减少 2%~82%,平均达 35%,这意味着在配对后这些成分的蒸出量减少,留在汤剂的量增多,可能会对汤剂的药效产生重要影响。配对后含量较大的脂肪酸(十二,十四,十六,油酸和 9,12-十八碳二烯酸等)含量降幅为 37%~64%,平均降幅高达 47%。在药对中含量大于单味药含量之和的成分的相对含量不大,主要是酯,醇,和烃类,增加 2%~317%,平均

69 %。有些单味药出现的成分在药对中未能检出,而药对中也出现了单味药没有的成分(见表 1)。上述这些变化的原因及可能的后果有待进一步研究。

参考文献:

[1] LUO Guo-an(罗国安),WANG Yi-ming(王义明),ROU Yi(饶毅). Chinese Traditional Patent Medicine(中成药)[J],2000,22(1):71.

[2] HONG Jing(洪净),WANG Yue-sheng(王跃生),CHAO Zhi-mao(巢志茂),BIAN Bao-lin(边宝林). China Journal of Chinese Materia Medica(中国中药杂志)[J],2004,29(2):98.

[3] ZENG Z D,LIANG Y Z,WANG Y L,LI X R,LIANG L M,XU Q S,ZHAO C X,LI B Y,CHAU F T.J. Chromatogr. A[J],2006,1107:273.

[4] GONG Fan(龚范),LIANG Yi-zeng(梁逸曾),SONG You-qun(宋又群),PENG Yuan-gui(彭源贵).J. Chinese Universities(高等学校化学学报)[J],2001,22(9):1481.

[5] Chinese Pharmacopoeia Committee(中国药典委员会). Chinese Pharmacopoeia(中国药典)[M]. Beijing(北京):Chemical Industry Press(化学工业出版社),2000:Appendix 64.

[6] HU Y,LIANG Y Z,LI B Y,LI X N.J. Agr. Food Chem. [J],2004,52:7771.

Analysis of Component Change in Glycyrrhiza
and Euphorbia Kansui Lion
Before and After They Form a Mixture

ZHOU Neng^{1,2}, LIANG Yi-zeng^{*1}, WANG Ping¹, ZENG Mao-mao¹

(1. College of Chemistry and Chemical Engineering, Research Center of Modernization
of Chinese Herbal Medicines, Central South University, Changsha 410083;

2. Department of Chemistry and Biology, Yulin Teachers College, Yulin, Guangxi 537000)

Abstract: Adopting GC/MS technique, the essential oil of an incompatible drug pair: *Glycyrrhiza uralensis* Fisch and *Euphorbia kansui* Lion and its single herbal medicine were investigated with tetradecane as internal standard and the help of a new chemometric method alternative moving window factor analysis (AMWFA) and heuristic evolving latent projections (HELP). 64,52,51 components were qualitatively and quantitatively analyzed by matching the resolved mass spectra in NIST bank and normalization of peak area, representing about 75%,84%,90% of the total content in GUF-EKL, GUF and EKL, respectively. In the same time, components in the drug pair and its single herbal medicine were compared by AMWFA.

Keywords: Alternative moving window factor analysis; Incompatible drug pair; Essential oil; *Glycyrrhiza uralensis* Fisch; *Euphorbia kansui* Lion; GC/MS