

鱼腥草注射液与其药材挥发油相关组分的分析

卢红梅¹ 郭方遒*¹ 伍贤进² 梁逸曾¹

¹(中南大学化学化工学院中药现代化研究中心,长沙 410083)

²(怀化学院生命科学系民族药用植物资源研究与利用湖南省重点实验室,怀化 418008)

摘要 利用 GC-MS 提供的二维化学数据信息,通过多组分波谱相关色谱方法及化学计量学分辨技术,对中试生产的鱼腥草注射液及其对应的药材挥发性成分进行比较和归属分析。结果表明,在药材和注射液图谱的 40 个峰族中,只有 5 个非相关峰族,即在药材制成成品注射液过程中,尽管大量组分出现了浓度消长的现象,但是成品注射液的绝大部分成分来自药材,其中仅有少数组分出现了消失和生成现象。

关键词 鱼腥草; 气相色谱-质谱; 多组分波谱相关色谱法; 挥发油; 相关组分

1 引言

鱼腥草注射液为鱼腥草经加工制成的灭菌水溶液,临床上广泛用于清热、解毒、利湿等^[1,2]。2006 年 6 月,因鱼腥草注射液出现注射不良反应,国家食品药品监督管理局宣布,在全国范围内暂停使用和审批鱼腥草注射液^[3]。尽管随后启动了产品调查和再评价工作,但是系统的研究工作及相关的科学数据还很缺乏。本实验采用气相色谱-质谱(GC-MS)法分离检测中试生产的鱼腥草注射液和鱼腥草药材挥发油成分,采用多组分波谱相关色谱法(MSCC)^[4]及化学计量学分辨方法对注射液与其药材挥发油成分的相关组分进行比较分析,对两者的色谱流出组分进行判断和归属分析,为中成药与药材中各组分的比较研究提供了方便且可行的分析方法,为鱼腥草注射液成分的归属提供基础研究数据。

2 实验部分

2.1 鱼腥草药材与供试品溶液的制备

鱼腥草药材采集于湖南省怀化市杨村鱼腥草种植基地实验园区,经怀化学院生物系鉴定。自然晾干 16 d,将鱼腥草地上部分切碎(1.5~2.0 cm),按照中国药典 2005 版第一部附录 XD 挥发油测定法提取并收集挥发油,置 4 °C 冰箱中保存备用。取 20 mL 挥发油,溶于 1 mL 正己烷中,进行 GC-MS 测定。

2.2 注射液与供试品溶液的制备

将自然晾干 16 d 的鱼腥草的地上部分制成注射液(湖南怀化正清制药厂中试车间)。取此注射液 200 mL 于圆底烧瓶中,并向挥发油提取器的收集管中加入约 1 mL 正己烷,按中国药典 2005 年版一部附录 XD 挥发油提取方法提取。收集含有挥发油组分的正己烷溶液,定容至 2 mL,备用。

2.3 仪器和测定条件

GC 2010 型气相色谱仪、QP 2010 质谱检测器(日本岛津公司);OV-1 毛细管柱(30 m × 0.25 mm i. d., 0.25 mm)。进样口温度 280 °C,检测器温度 230 °C,载气为氦气,恒流模式,流速 0.70 mL/min,分流比 10:1,程序升温:起始温度为 50 °C,保持 6 min;以 10 °C/min 的速度升温至 230 °C,保持 16 min。进样量:1.0 mL。质谱检测器,电离方式 EI,电离能量 70 eV,质量范围 20~450 U,扫描间隔:0.2 s/次。

3 理论分析

多组分波谱相关色谱方法主要用于分析两色谱峰簇的相关性^[4,5]。联用色谱测定两个样品而得到相应的色谱图,即二维波谱色数据 X 、 Y 。子矩阵 X_{target} 为图谱 X 中的目标色谱峰(簇),子矩阵 Y_{test} 表示 Y

2011-01-10 收稿;2011-03-21 接受

本文系国家自然科学基金(No. 20975115)、湖南省科技计划(No. 2009GK3095)和中南大学“升华育英计划”资助项目

* E-mail: fq18guo@yahoo.com.cn

中的待测组分色谱峰簇。首先, 对 X_{target} 进行奇异值分解, 如式 (1) 所示, 并从中提取各组成物质的波谱。

$$X_{\text{target}} = U_p S_p V_p^T + E \quad (1)$$

其中, U_p 和 V_p 分别表示得分矩阵和荷载矩阵, 含有 X_{target} 的 p 个组分的色谱和波谱信息。 S_p 为对角阵, 收集了 X_{target} 矩阵的特征值, 表征了各组分在该色谱峰(簇)中的权重。 E 为误差, 包含了实验和仪器误差。上标 T 表示矩阵的转置。

将荷载矩阵 V_p 定义为关键波谱矩阵, 然后用其构建正交投影矩阵 P ,

$$P = I - V_p V_p^T \quad (2)$$

式中, I 为单位矩阵, 用正交投影矩阵 P 对二维图谱数据 Y 的每一色谱流出位置对应的波谱矢量 y_j 进行投影运算,

$$y_j^{\text{op}} = P y_j \quad (j = 1, \dots, m) \quad (3)$$

式中, y_j^{op} 为波谱 y_j 的投影残差。

如果原始波谱 y_j 与关键波谱矩阵 V_p 的波谱相关, 则 y_j^{op} 为 0 矢量, 对其求模后应为 0, 即:

$$r_j = \|y_j^{\text{op}}\| = 0 \quad (4)$$

然而, 考虑到仪器背景噪声等因素, 尤其是不等性噪声 (Heteroscedastic noise) 的影响^[6-8], 波谱相关色谱方法以投影后所得的残差波谱 y_j^{op} 与投影前的原始波谱 y_j 的内积 (Inner-product coefficient) 为判据, 即

$$r_j = \frac{y_j^T y_j^{\text{op}}}{\|y_j\| \|y_j^{\text{op}}\|} \quad (j = 1, 2, \dots, m) \quad (5)$$

r_j ($j = 1, \dots, m$) 的值为 $0 \leq r_j \leq 1$ 。再以 r_j 对 Y 的色谱流出时间作图。根据此图判断图谱 Y 中是否存在与 X_{target} 相关的色谱峰(簇)。如果图谱 Y 中的色谱峰(簇) Y_{test} 与 X_{target} 所含有的化学组分波谱相关, 那么 Y_{test} 所在的色谱区间对应的 r_j 等于零或接近于零。否则, r_j 等将远大于零。

4 结果与讨论

4.1 多组分光谱相关色谱用于药材与注射液重叠色谱峰的比较

图 1 为鱼腥草注射液和药材挥发油成分 GC-MS 总离子流图(TIC)。为了方便比较, 将注射液的 TIC 画为负方向。根据联用仪器及工作站提供的色谱和波谱数据, 只能对一些比较纯的色谱峰进行比较。但由于中药样品十分复杂, 不可能使所有的组分都达到分离。因此对重叠色谱峰的比较和分析, 需要借助化学计量学和计算机技术。以下讨论用波谱相关色谱方法对鱼腥草和注射液样品中的重叠色谱

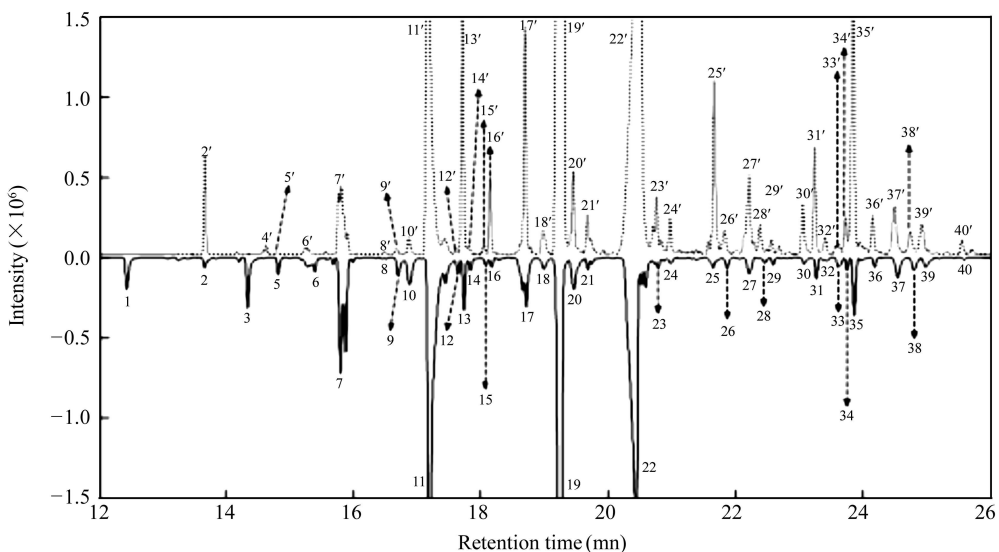


图 1 鱼腥草药材和注射液挥发油的总离子流色谱图(TIC)(虚线为药材的 TIC, 实线为注射液的 TIC)

Fig.1 Total ion chromatogram(TIC) curves of volatile oils of *Houttuynia cordata* and its injection (dotted line herb and solid line injection)

峰进行快速的比较分析方法。

以图 1 中保留时间范围 15.73~ 16.00 min 的注射液样品的色谱峰簇 Peak 6 (图 2a) 和保留时间范围 15.69~ 16.00 min 的鱼腥草药材样品的色谱峰簇 Peak 6' (图 2b) 的 GC-MS 二维量测数据为例, 阐述多组分波谱相关色谱在药材和成品组分重叠色谱峰比较研究中的应用。依据多组分波谱相关色谱方法, 从注射液及鱼腥草药材二维数据图中截取 Peak 6 与 Peak 6' 数据矩阵 X_1 和 X_2 , 利用主成分分析估计注射液色谱峰簇 X_1 的组分数为 3; 再由奇异值分解 (式 1) 计算色谱峰簇 X_1 的关键波谱 V_3 。用 V_3 构建投影矩阵 $P (P = (I - V_3 V_3^T))$ (式 2), 并根据式 (3) 对药材的二维波谱数据 X_2 的每个色谱流出位置对应的波谱矢量 y_j 进行投影运算, 计算每个色谱峰的波谱矢量与投影后的波谱残差的相关系数 r_j , 因而得到一条随色谱流出时间变化的波谱相关色谱曲线 (图 2d)。从图 2d 可见, 在 15.75~ 15.85 min 内的波谱相关色谱曲线接近零。该区间为鱼腥草药材的色谱峰簇 X_2 所在的部分区域, 而另一侧区域的波谱相关色谱曲线值较大。这就说明色谱峰簇 X_2 只有在 15.75~ 15.85 min 保留时间范围内与三组分峰簇含有相同的化学物质, 其余组分不同。

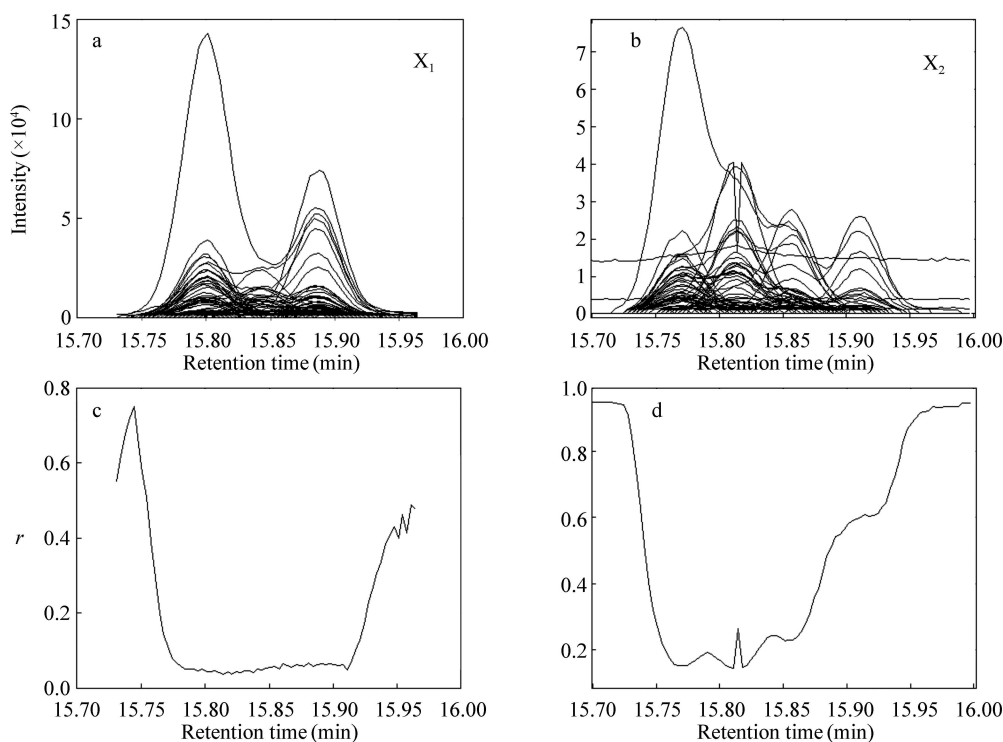


图 2 Peak 6 和 Peak 6' 的二维数据图及其波谱相关色谱图

Fig. 2 Spectrochromatograms of Peak 6 and Peak 6' as well as their spectral correlative chromatograms

a. 注射液中峰簇 Peak 6 的二维数据图; b. 鱼腥草药材中峰簇 Peak 6' 的二维数据图; c. 色谱峰簇 X_2 对 X_1 投影所得的波谱相关色谱图; d. 色谱峰簇 X_1 对 X_2 投影所得的波谱相关色谱图。a. The two-dimensional spectrochromatogram of Peak 6; b. the two-dimensional spectrochromatogram of Peak 6'; c. the spectral correlative chromatogram of X_2 onto X_1 ; d. the spectral correlative chromatogram of X_1 onto X_2 .

以药材的色谱峰簇 X_2 构建投影矩阵, 进而判断注射液中与之波谱相关的色谱峰簇。从 X_2 的二维波谱数据中提取 4 个组分的关键波谱 V_4 ; 对注射液的二维数据图谱进行波谱投影运算, 得到另一条波谱相关色谱曲线 (图 2c)。从图 2c 中的波谱相关色谱曲线可见, X_1 在保留时间 15.78~ 15.92 min 范围内的流出组分与 X_2 的组分波谱相关, 即 X_1 中在该保留时间内的组分与药材的 X_2 所含的组分相同。上述分析结果表明, 注射液 X_1 在 15.78~ 15.92 min 内的流出组分源于药材, 而药材 X_2 中的另一些成分在注射液中消失。

4.2 直观推导式演进特征投影法 (HELP) 用于药材与注射液重叠色谱峰的分辨

为进一步证实上述结果, 用直观推导式演进特征投影法 (HELP) [9, 10] 分辨两色谱峰簇 Peak 6 与

Peak 6 所含的化学成分, 各组分的纯色谱浓度轮廓和质谱见图 3。比较图 3 中各组分的解析结果可知: Peak 6 与 Peak 6' 分别含有 3 和 4 个组分, 注射液的组分 1 (*Z*-2, 6-Dimethyl-3, 5, 7-octatriene-2-ol), 2 (Linalool) 和 3 (Lauraldehyde) 分别来源于鱼腥草中的组分 1' (*Z*-2, 6-Dimethyl-3, 5, 7-octatriene-2-ol),

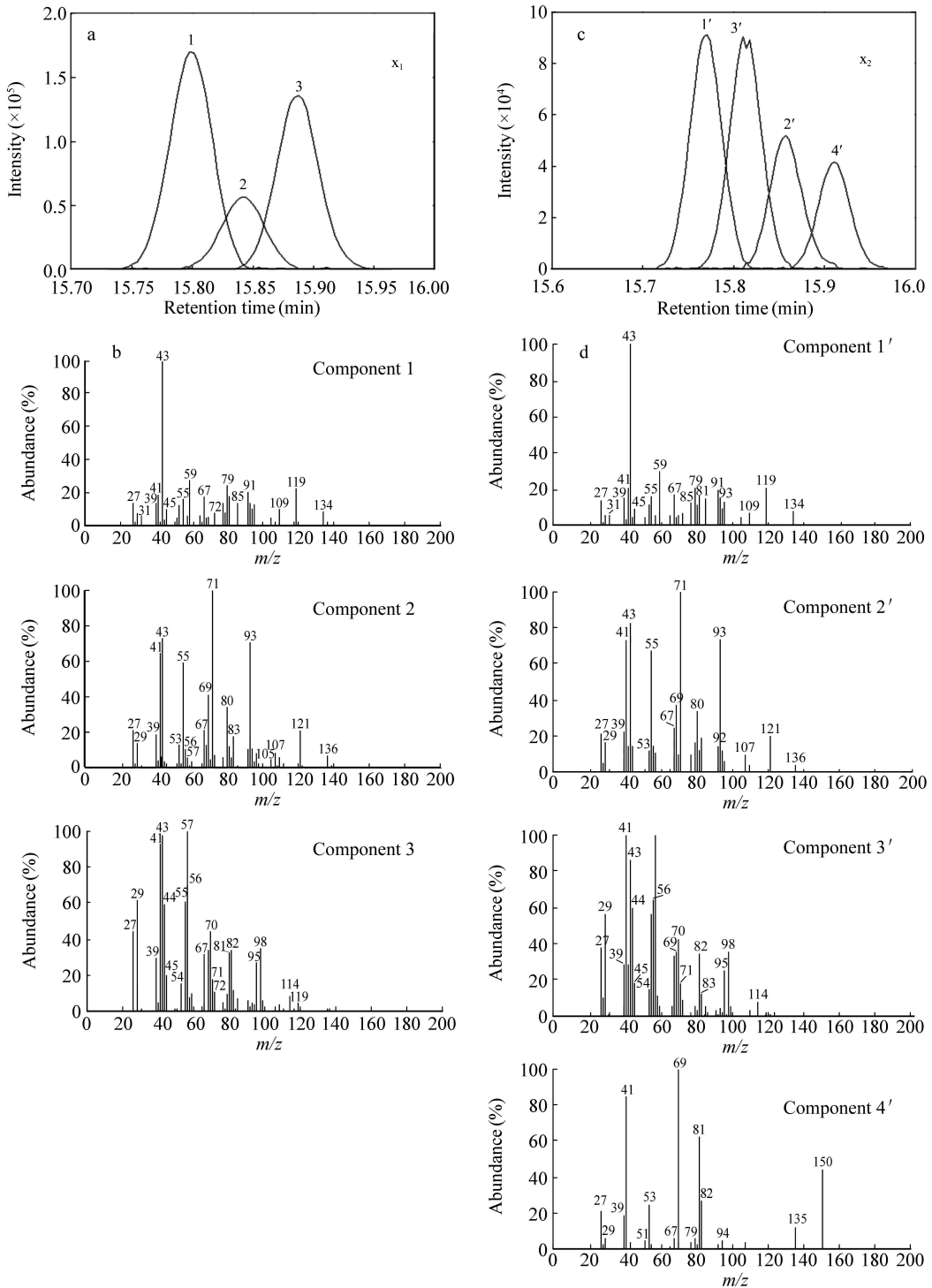


图 3 Peak 6 和 Peak 6' 分辨所得的色谱和质谱

Fig. 3 Resolved chromatograms and spectra of Peak 6 and Peak 6'

a. 分辨色谱峰簇 Peak 6 所得的 3 个组分色谱图; b. 分辨色谱峰簇 Peak 6 所得的 3 个组分质谱图; c. 分辨色谱峰簇 Peak 6' 所得的 4 个组分色谱图; d. 分辨色谱峰簇 Peak 6' 所得的 4 个组分质谱图。a. Resolved chromatogram of Peak 6; b. resolved spectra of Peak 6; c. resolved chromatogram of Peak 6'; d. resolved spectra of Peak 6'

2' (Linalool) 和 3' (Lauraldehyde); 鱼腥草 X₂ 中的组分 4' (Perillene) 在注射液中消失。这与图 2 中用多组分波谱相关色谱方法判断不同色谱峰(簇)的相关性结果完全一致。

综上所述,多组分波谱相关色谱方法可以直接利用联用仪器(GC-MS)提供的二维波谱信息快速判断成品和药材的量测图谱中各色谱峰(簇)的组分相关性,而无需对重叠色谱组分进行分辨解析,更不需要知道各色谱组分的具体化学物质,这对于一些严重重叠的色谱峰簇的比较尤为适用。将其用于药材和成品化学组分的消长变化追踪,既节省分析时间,又可降低分析成本。同理,可以用多组分波谱相关色谱方法对图 1 中其它重叠的色谱峰簇进行相关性判断。结果发现,在药材和注射液图谱的 40 个峰簇中,只有 5 个非相关的峰簇(Peak 1, 3, 4, 7 和 27)。即在药材制成成品注射液过程中,尽管大量组分出现了浓度消长现象,但是成品注射液的绝大部分成分来自药材,其中只有相当少数组分出现了消失(Peak 4, 7 和 27)和生成(Peak 1 和 3)现象。结果表明,鱼腥草注射液中的绝大部分组分来自药材鱼腥草。

References

- 1 China Pharmacopoeia Committee(中国国家药典委员会). *Chinese Pharmacopoeia*(Part 1) (中华人民共和国药典,一部). Beijing(北京): China Medical Science Press(中国医药科技出版社), 2010: 208~ 209
- 2 Ministry of Health of the People's Republic of China(国家卫生部). *Drug Standards for Preparations of Chinese Medicine Prescription, Volume* (卫生部药品标准中药成方制剂第十八册). WS3-B-3264-98. 1996
- 3 Ji K M, Li M, Chen J J, Zhan Z K, Liu Z G. *Allergy*, 2009, 64(5): 816~ 817
- 4 HU Yun, LIANG Y+Zeng, LI Bo-Yan, XU Cheng-Jian, ZENG Zhong-Da(胡芸, 梁逸曾, 李博岩, 徐承建, 曾仲大). *Acta Chimica Sinica*(化学学报), 2003, 61(9): 1466~ 1470
- 5 Hu Y, Liang Y Z, Li B Y, Li X N, Du Y P. *J. Agric. Food Chem.*, 2004, 52(26): 7771~ 7776
- 6 Keller H R, Massart D L, Liang Y Z, Kvalheim O M. *Anal. Chim. Acta*, 1992, 263(1-2): 29~ 36
- 7 Ritter C, Gilliard J A, Cumps J, Tilquin B. *Anal. Chim. Acta*, 1996, 318(2): 125~ 136
- 8 Kvalheim O M, Brakstad F, Liang Y Z. *Anal. Chem.*, 1994, 66(1): 43~ 51
- 9 Kvalheim O M, Liang Y Z. *Anal. Chem.*, 1992, 64(8): 936~ 946
- 10 Liang Y Z, Kvalheim O M, Keller H R, Massart D L, Kiechle P, Erni F. *Anal. Chem.*, 1992, 64(8): 946~ 953

Analysis of Related Volatile Constituents in *Houttuynia Cordata* Injection and Its Raw Material Herb

LU Hong-Mei¹, GUO Fang-Qiu¹, WU Xian-Jin², LIANG Y+Zeng¹

¹(Research Center for Modernization of Chinese Herbal Medicine, College of Chemistry and Chemical Engineering, Central South University, Changsha 410083)

²(Key Laboratory of Hunan Province for Study and Utilization of Ethnic Medicinal Plant Resources, Department of Life Science, Huaihua College, Huaihua 418008)

Abstract The comparison and attribution analysis of volatile oil in *Houttuynia cordata* injection from pilot production and the corresponding herb were conducted, after the combination of multicomponent spectral correlative chromatography and chemometric resolution technique, based on the two-dimensional data from hyphenated chromatography GC-MS. The results showed that there were only 5 non-related Peaks among 40 Peaks of the injection and herb spectrochromatograms. That is, although the concentration of a large number of components fluctuated during the injection production process, most of ingredients in finished product injection came from the raw material herb. Only a very small number of components disappeared and occurred.

Keywords *Houttuynia cordata* Thunb.; Gas chromatography-mass spectrometry; Multicomponent spectral correlative chromatography; Volatile oil; Related component

(Received 10 January 2011; accepted 21 March 2011)